



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2014

Sónia Isabel dos
Santos Coimbra

Efeito fotodinâmico nos ácidos nucleicos de *E. coli*



Universidade de Aveiro
2014

Departamento de Química

Sónia Isabel dos
Santos Coimbra

Efeito fotodinâmico nos ácidos nucleicos de *E. coli*

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Molecular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida e Professora Doutora Maria do Amparo Ferreira Faustino, Professoras Auxiliares respetivamente do Departamento de Biologia e do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

O júri

Presidente

Doutor João Manuel da Costa e Araújo Pereira Coutinho
Professor auxiliar do departamento de Química da Universidade de Aveiro

Vogais

Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida (orientadora)
Professora auxiliar do departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Ana Sofia Duarte
Investigadora do departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

À professora Doutora Adelaide Almeida, orientadora da tese, pelo constante apoio e incentivo e pela inteira disponibilidade e dedicação a este trabalho.

À professora Doutora Amparo Faustino, coorientadora da tese, pelo acompanhamento, interesse e dedicação demonstrados para com este trabalho.

Ao Doutor Newton Gomes pelas sugestões e apreciações críticas prestadas.

Ao Doutor Artur Alves e ao professor Doutor António Correia, pelas sugestões, críticas construtivas e pelo tempo cedido.

À Eliana Alves, pelo contributo prestado, por todas as sugestões e pela motivação.

À Maria Bartolomeu, pela simpatia, generosidade e profissionalismo com que sempre contribuiu para este trabalho.

À Clara Gomes, responsável pela síntese das porfirinas utilizadas neste trabalho.

Aos técnicos de laboratório, Helena Dias, Armando Costa e Conceição Saraiva pela simpatia e disponibilidade.

À Carla Pereira e Vanessa Oliveira, pela simpatia e prontidão com que se disponibilizaram a partilhar os seus conhecimentos.

À Diana Salzedas, pelo apoio. Aos restantes colegas de laboratório que, sempre que precisei, me ajudaram: Marina Ferreira, Carina Costa, Sónia Pereira, Liliana Rosa, Mariana Mesquita, Cristiana Mateus, Susana Machado, José Gonçalves.

À minha avó, Maria Isménia Ribafeita e ao meu avô, Mário dos Santos, por tudo. À minha mãe e aos meus irmãos, pelo apoio.

palavras-chave Inativação fotodinâmica, porfirina catiônica, *Escherichia coli*, ácidos nucleicos, extração e quantificação de ácidos nucleicos, eletroforese em gel de agarose

resumo O aumento do número de microrganismos resistentes a antibióticos constitui uma das grandes problemáticas da atualidade, tornando-se pertinente encontrar terapias alternativas de tratamento de doenças infecciosas. A inativação fotodinâmica (PDI) tem sido proposta como alternativa para o controle de infecções. A PDI consiste na destruição de microrganismos através da interação entre três componentes: luz, uma molécula de fotossensibilizador e oxigênio na forma molecular.

Apesar de existirem numerosos estudos que demonstram a eficiência da PDI em diferentes tipos de microrganismos e com recurso a diferentes fotossensibilizadores, o mecanismo de PDI, ainda não se encontra completamente compreendido, principalmente no que diz respeito ao dano causado no DNA. De um modo geral, são considerados dois mecanismos principais, propostos para os efeitos letais causados nas bactérias pelo processo de PDI: este processo pode produzir alterações na parede celular ou provocar danos no DNA, sendo que os danos na parede celular são, de um modo geral, referidos como os principais responsáveis pela inativação celular.

O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito fotodinâmico nos ácidos nucleicos de *E. coli* usando como fotossensibilizadores duas porfirinas catiônicas, a tetra-iodeto de 5,10,15,20-tetraquis(1-metilpiridínio-4-il)porfirina (Tetra-Py⁺-Me) e a tri-iodeto de 5,10,15-(1-metilpiridínio-4-il)-20-(pentafluorofenil)porfirina (Tri-Py⁺-Me-PF). Neste sentido, recorreu-se a duas abordagens metodológicas diferentes. No primeiro caso, procedeu-se à fotoinativação das células de *E. coli* durante diferentes períodos de tempo e extraíram-se os ácidos nucleicos subsequentemente (efeito indireto). No segundo caso, os ácidos nucleicos foram extraídos de células de *E. coli* e irradiados posteriormente (efeito direto). Em ambas as abordagens metodológicas, os ácidos nucleicos foram analisados por eletroforese em gel de agarose e quantificados por fluorometria.

Em geral, os perfis eletroforéticos dos ácidos nucleicos extraídos das células de *E. coli* após PDI mostram uma diminuição na quantidade de DNA genómico ao longo do tempo, diretamente proporcional à inativação das células. Com a porfirina Tri-Py⁺-Me-PF, a diminuição de DNA genómico ocorreu mais rapidamente, comparativamente com a porfirina Tetra-Py⁺-Me. Relativamente aos perfis eletroforéticos dos ácidos nucleicos extraídos das células de *E. coli* não irradiadas e posteriormente irradiadas na presença do fotossensibilizador, observou-se que não ocorreu variação na quantidade de DNA genómico ao longo do tempo, contudo, observou-se uma diminuição na quantidade de rRNA ao longo do tempo. Embora não tenham sido observados danos no DNA, não se exclui a possibilidade de terem ocorrido danos não detetáveis com a metodologia utilizada neste estudo.

keywords

Photodynamic inactivation, cationic porphyrin, *Escherichia coli*, nucleic acids, nucleic acid extraction, agarose gel electrophoresis

abstract

The increase of antibiotic resistance among pathogenic microorganisms is a major public health issue, making it relevant to find alternative therapies for the treatment of infectious diseases. Photodynamic inactivation (PDI) has been proposed as an alternative approach for the treatment of infections. PDI consists in destroying microorganisms through the interaction of three components: light, photosensitizer and molecular oxygen.

Although there are numerous studies showing the efficiency of PDI in the inactivation of different types of microorganisms, by different photosensitizers, the mechanism of PDI is not yet fully understood. In general, two main mechanisms are proposed for the lethal effects of PDI on bacterial cells: the PDI process can produce cell membrane damages or cause DNA damage. The damages of the membrane are generally referred to as the main responsible for cell inactivation.

The aim of this study was to analyze the photodynamic effect on *E. coli* nucleic acids, using two cationic porphyrins as photosensitizers (5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrin tetra-iodide (Tetra-Py⁺-Me) and 5,10,15-tris(1-methylpyridinium-4-yl)-20-(pentafluorophenyl)porphyrin tri-iodide (Tri-Py⁺-Me-PF). In this study, we used two different methodological approaches. In the first approach, the *E. coli* nucleic acids were extracted from photosensitized cells (indirect effect). In the second approach, the nucleic acids were extracted from non-irradiated *E. coli* cells and irradiated in the presence of the PS (direct effect). In both cases, nucleic acids were analyzed by agarose gel electrophoresis and quantified by fluorometry.

In general, the electrophoretic profiles of nucleic acids extracted from *E. coli* cells after PDI reveal decreases in the amount of genomic DNA over time, which are directly proportional to the cell inactivation. The porphyrin Tri-Py⁺-Me-PF induced a faster decrease of the genomic DNA over time, in comparison with Tetra-Py⁺-Me porphyrin. The electrophoretic profiles of nucleic acids of *E. coli* irradiated in the presence of photosensitizer show no variation in the amount of genomic DNA over time. In this last case, there was a decrease in the amount of rRNA. Although no damage was observed in the DNA, we cannot exclude the possibility of the occurrence of damages which are not detectable by the methodology applied in this study.

ABREVIATURAS

bp	Pares de bases
CC	Controlo claro
CE	Controlo escuro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO	Densidade ótica
dsDNA	DNA de cadeia dupla
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FS	Fotossensibilizador
HOMO	Orbital molecular ocupada de energia mais elevada (<i>highest occupied molecular orbital</i>)
Hp	Hematoporfirina
HpD	Derivados de hematoporfirina
Kb	Kilobase
LUMO	Orbital molecular desocupada de energia mais baixa (<i>Lowest unoccupied molecular orbital</i>)
mL	Mililitro
PAR	Radiação fotossinteticamente ativa
PBS	Tampão fosfato salino
PDI	Inativação fotodinâmica
PDT	Terapia fotofinâmica
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
ROS	Espécies reativas de oxigénio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tetra-Py ⁺ -Me	Tetra-iodeto de 5,10,15,20-tetraquis(1-metilpiridino-il)porfirina
Tri-Py ⁺ -Me-PF	Tri-iodeto de 5,10,15-(1-metilpiridinio-4-il)-20-(pentafluorofenil)porfirina
TSA	<i>Tryptic soy agar</i>
TSB	<i>Tryptic soy broth</i>

ÍNDICE

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
1.1. EFEITO FOTODINÂMICO E TERAPIA FOTODINÂMICA	3
1.2. A PROBLEMÁTICA DA RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS	4
1.3. INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA (PDI) DE MICRORGANISMOS	5
1.4. PROPRIEDADES DOS FOTOSSENSIBILIZADORES	9
1.5. ALVOS CELULARES DA PDI	12
1.6. OBJETIVO DO TRABALHO	20
CAPÍTULO 2 – MÉTODOS.....	21
2.1. FOTOSSENSIBILIZADORES	23
2.2. ESTIRPES BACTERIANAS E PREPARAÇÃO DAS CULTURAS	23
2.3. EFEITO INDIRETO	23
2.4. CONDIÇÕES DE IRRADIAÇÃO	24
2.5. EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS	24
2.6. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	25
2.7. QUANTIFICAÇÃO DE DNA	26
2.8. EFEITO DIRETO	27
CAPÍTULO 3 – RESULTADOS.....	29
3.1. INTERPRETAÇÃO DOS PERFIS ELETROFORÉTICOS OBTIDOS	31
3.1.1. EFEITO INDIRETO	31
3.1.2. EFEITO DIRETO	33
3.2. DECRÉSCIMO DE dsDNA E O DECRÉSCIMO DE CÉLULAS - COMPARAÇÃO	35
3.3. EFICIÊNCIA DE INATIVAÇÃO DOS DOIS FOTOSSENSIBILIZADORES	37
CAPÍTULO 4 – DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	39
DISCUSSÃO	41
CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	45

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1.1. EFEITO FOTODINÂMICO E TERAPIA FOTODINÂMICA

O efeito fotodinâmico foi definido em 1907 por Von Tappeiner e Jodlbauer, referindo-se ao dano e destruição de células ou tecidos vivos, na presença de uma fonte de luz, de um fotossensibilizador (FS) e oxigénio (Mitton et al., 2008). O efeito fotodinâmico foi inicialmente observado em 1889 por Oscar Raab, um estudante de medicina que se encontrava a estudar os efeitos do corante vermelho de acridina em células de *Paramecium caudatum*, sob orientação do Professor Herman von Tappeiner, na cidade de Munique (Mitton et al., 2005; Mitton et al., 2008). Oscar Raab descobriu que a interação entre o corante vermelho de acridina com a luz produzia um efeito letal sobre as células de *Paramecium caudatum* e demonstrou que o efeito combinado destes dois componentes foi superior ao efeito isolado de cada um deles e ao efeito do corante vermelho de acridina exposto à luz antes de ser adicionado às células em estudo (Mitton et al., 2005; Mitton et al., 2008). Em 1903, Jesionek (médico dermatologista) e von Tappeiner relataram a obtenção de bons resultados no tratamento de cancro de pele após aplicação tópica de uma solução de eosina a 5% (Mitton et al., 2008).

A terapia fotodinâmica (PDT – *Photodynamic Therapy*) é um tratamento para o cancro e outras doenças, baseada no efeito fotodinâmico (Henderson et al., 1992). A PDT requer a presença de um FS no tecido a ser tratado, luz visível de comprimento de onda adequado à absorção pelo FS e oxigénio. O efeito combinado destes três componentes resulta na morte das células alvo (Henderson et al., 1992).

A PDT foi descoberta por Lipson e Baldes em 1960 na clínica Mayo, nos Estados Unidos da América (Kessel, 2004). Estes autores relataram a fluorescência de tecidos neoplásicos de pacientes submetidos a cirurgia, após administração de uma mistura de hematoporfirina (Hp), o que é indicativo das propriedades de localização de tumores da Hp (Kessel, 2004). A Hp foi preparada pelo Dr. Samuel Schwartz (Kessel, 2004). Posteriormente, Schwartz tratou a HP com ácido acético e ácido sulfúrico, a fim de otimizar as suas propriedades de localização de tumores, tendo obtido uma mistura de porfirinas denominada de derivado de hematoporfirina (HpD) (Kessel, 2004). A HpD é também conhecida como fotofrina, representando o FS mais amplamente usado em PDT (Kessel, 2004). Estes derivados são geralmente designadas de FS de primeira geração; os FS de segunda geração correspondem aos derivados porfirínicos sintéticos produzidos a

partir da década de 1980; os FS de terceira geração referem-se a derivados modificados conjugados com anticorpos, entre outros (Kessel, 2004).

Desde a década de 1990, a PDT tem sido utilizada com sucesso no tratamento de muitos tumores, incluindo os cânceros de pele, da cavidade oral, do pulmão, do esôfago, da bexiga e do pescoço (Kessel, 2004).

A PDT aplicada à inativação de microrganismos designa-se de inativação fotodinâmica (PDI, *Photodynamic Inactivation*), tendo adquirido um interesse crescente ao longo dos anos, principalmente devido ao aparecimento de microrganismos resistentes a antibióticos ou a outras terapias convencionais (Denis et al., 2011; Vera et al. 2012).

1.2. A PROBLEMÁTICA DA RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

Um dos acontecimentos científicos mais importantes do século XX foi, indubitavelmente, o desenvolvimento de estratégias eficientes de prevenção e controlo de doenças infecciosas (Denis et al., 2011; Vera et al. 2012). A descoberta da penicilina e subsequente desenvolvimento de novos antibióticos permitiu combater eficazmente diversos microrganismos patogénicos (Denis et al., 2011). Contudo, o uso extensivo e inapropriado de antibióticos levou ao aparecimento gradual de microrganismos resistentes a estes agentes antimicrobianos (Jori et al, 2007; Denis et al., 2011). Entre os microrganismos resistentes a antibióticos podem destacar-se as espécies bacterianas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina, as quais são consideradas fortes ameaças à saúde pública (Jori et al., 2007; Denis et al., 2011).

Atualmente, as doenças infecciosas são a segunda principal causa de morte no mundo, ocupando o terceiro lugar na Europa e o quarto lugar nos Estados Unidos da América (Denis et al., 2011). De acordo com a literatura, morrem cerca de 13 milhões de pessoas por ano no mundo, em consequência de infeções bacterianas (Vera et al. 2012).

O decréscimo da eficiência dos antibióticos, devido ao aparecimento de microrganismos resistentes, conduz assim à necessidade de desenvolver terapias alternativas e eficientes de inativação de microrganismos (Caminos et al., 2008; Spesia et al., 2009; Spesia et al., 2010). Neste contexto, a inativação fotodinâmica de bactérias representa uma potencial e importante alternativa ao uso de antibióticos (Jori et al., 2004;

Jori et al., 2007; Perussi, 2007; Caminos et al., 2008; Spesia et al., 2010; Vera et al., 2012; Spesia et al., 2013).

1.3. INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA (PDI) DE MICRORGANISMOS

A inativação fotodinâmica consiste na destruição de microrganismos através da interação entre três componentes: luz, oxigénio na forma molecular e um FS (Caminos et al., 2008; Alves et al., 2013; Spesia et al., 2013).

A PDI está intrinsecamente relacionada com a capacidade de absorção de energia proveniente da luz, por parte de um FS, transferindo essa energia para oxigénio molecular (Costa et al., 2012). No escuro, a configuração eletrónica do FS designa-se de estado fundamental, na qual os eletrões ocupam orbitais energia mais baixa. Assim, quando se aplica luz com o comprimento de onda de absorção do FS, o FS absorve um fóton, atingindo um estado eletronicamente excitado, que se caracteriza por ser instável e ter tempo de vida curto (10^{-9} a 10^{-6} segundos) (Costa et al., 2012). A molécula do FS no estado excitado pode regressar ao estado fundamental através da emissão de luz (mecanismo radiativo - fluorescência) ou pode atingir o estado tripleto por cruzamento intersistema. Neste ponto (estado tripleto), o FS pode atingir o estado fundamental por inversão do spin eletrónico seguido de emissão de fosforescência, ou por um processo não-radiativo (Costa et al., 2012). Devido ao tempo de vida longo, característico do estado tripleto do FS, este estado excitado pode reagir de uma de duas maneiras: iniciando as reações fotoquímicas que podem originar diretamente espécies reativas de oxigénio (ROS) (mecanismo do tipo I), ou indiretamente, por transferência de energia para o oxigénio molecular (mecanismo do tipo II), levando à formação de oxigénio singuleto (Figura 1) (Costa et al., 2012). Estas reações produzem espécies altamente citotóxicas, responsáveis por causar danos oxidativos irreparáveis em alvos biológicos importantes (Costa et al., 2012).

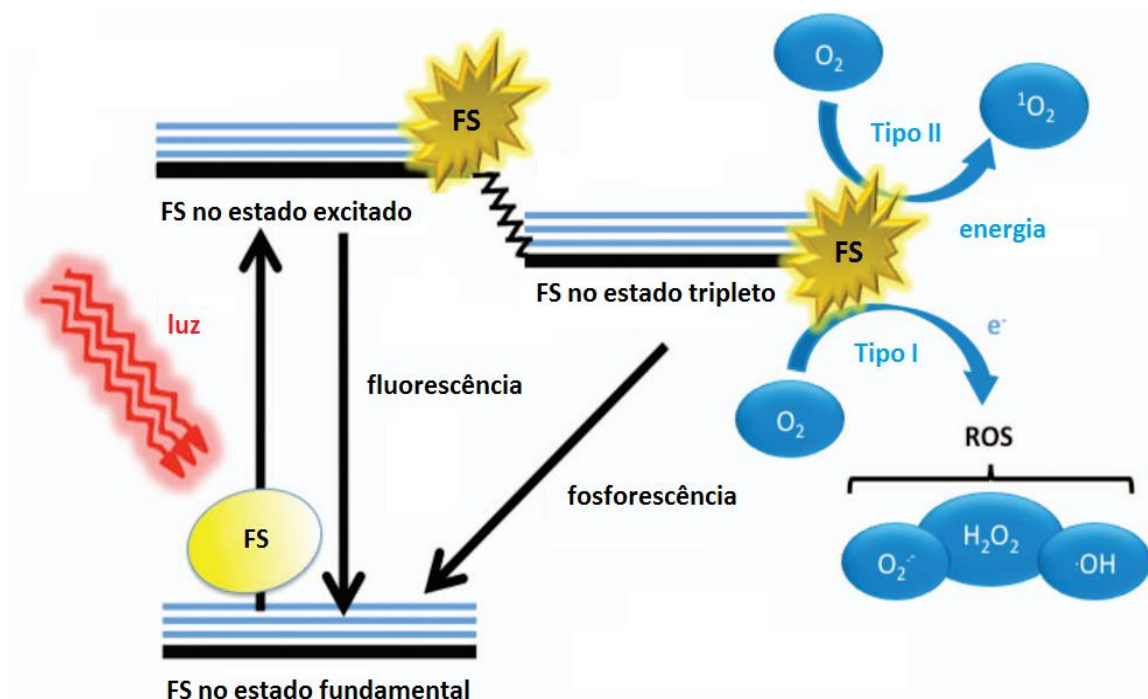


Figura 1. Esquema representativo do processo fotodinâmico, de acordo com o diagrama de Jablonski. O FS no estado fundamental inicialmente absorve um fóton e atinge o estado excitado, caracterizado por um curto tempo de vida. O FS no estado excitado pode atingir um estado de menor energia mas com um tempo de vida mais longo – estado tripleto. O FS no estado tripleto pode interagir com o oxigênio molecular de acordo com dois mecanismos, tipo I e tipo II, levando à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou oxigênio singuleto, respetivamente. Figura adaptada de Denis et al., 2011.

No processo de PDI, a luz, o oxigênio e o FS, interagem através de dois mecanismos. O fotossensibilizador excitado pela luz pode reagir diretamente com um substrato (mecanismo do tipo I) ou com oxigênio na forma molecular (mecanismo do tipo II) (Denis et al., 2011; Alves et al., 2013). O mecanismo do tipo I produz peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e radicais livres e o mecanismo do tipo II origina oxigénio singuleto (1O_2) (Huang et al., 2012, Alves et al., 2013; Spesia et al., 2013). As espécies reativas de oxigénio (ROS) que se originam nestas reações (radicais livres e oxigénio singuleto) são altamente citotóxicas, tendo a capacidade de oxidar várias estruturas biológicas e biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos e lípidos) e consequentemente inativar as células (Lin et al., 2012; Alves et al., 2013). As reações dos mecanismos do tipo I e tipo II podem ocorrer simultaneamente e a taxa a que estas reações ocorrem depende do tipo de FS usado e do microambiente em torno da molécula do FS (Huang et al., 2012).

O oxigénio singuleto reage com quase todos os componentes celulares, uma vez que os compostos orgânicos insaturados são, de forma geral, suscetíveis à ação do oxigénio

singuleto (Perussi, 2007). Como a primeira barreira para o oxigênio singuleto é a parede celular dos microrganismos, a qual é composta por lípidos insaturados, esta biomolécula constitui um alvo importante da PDI (Perussi, 2007). Uma vez que a reatividade das espécies reativas de oxigênio com moléculas orgânicas não é específica, qualquer macromolécula dentro da célula pode ser um potencial alvo para o processo de inativação fotodinâmica (Perussi, 2007). Assim, este processo é designado de terapia multialvo (Denis et al., 2011). A multiplicidade de alvos (lípidos, proteínas e DNA) faz com que esta terapia possa ser eficazmente aplicada a diferentes microrganismos, nomeadamente fungos, bactérias e vírus e com que seja difícil as células desenvolverem resistência celular, sendo estas duas das principais vantagens da inativação PDI (Perussi, 2007).

Os microrganismos apresentam diferentes suscetibilidades à PDI (Sharma et al., 2011). No caso das bactérias, estas diferenças devem-se, principalmente, às diferenças na morfologia da parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Sharma et al., 2011). As bactérias Gram-positivas contêm uma parede celular composta por peptidoglicano e ácido lipoteicoico, tornando a parede porosa (Figura 2) (Sharma et al., 2011). As bactérias Gram-negativas apresentam uma parede celular mais complexa e não porosa, composta por duas camadas, membrana interna e a membrana externa, sendo que entre estas se encontra o periplasma, que contém peptidoglicano (Sharma et al., 2011).

As bactérias Gram-positivas são sensíveis à ação fotossensibilizadora de uma vasta gama de FS neutros, aniônicos e catiónicos, que rapidamente atravessam as camadas relativamente porosas de peptidoglicano que constituem estas células (Camino et al., 2008, Alves et al., 2013).

A membrana externa das bactérias Gram-negativas funciona como uma barreira de permeabilidade, uma vez que tem a capacidade de excluir macromoléculas e substâncias hidrofílicas. Esta característica encontra-se intrinsecamente relacionada com a resistência destas bactérias a compostos antimicrobianos (Nikaido, 2001; Denyer et al., 2002; Huang et al., 2012). A presença de lipopolissacarídeos na membrana externa de bactérias Gram-negativas confere-lhes uma forte carga negativa, fazendo com que sejam impermeáveis a compostos neutros ou aniônicos (Camino et al., 2008). Contudo, nestas bactérias, os FS aniônicos podem ser eficazes se forem combinados com agentes de permeabilização de membranas (Camino et al., 2008). No início dos anos 1990s descobriu-se que as bactérias Gram-negativas são eficientemente inativadas com FS catiónicos (Malik et al., 1992;

Huang et al., 2012; Alves et al., 2013), que podem interagir electrostaticamente com os constituintes da membrana externa da parede celular, carregados negativamente (lipoproteínas, lipopolissacarídeos), o que facilita a sua ligação e entrada na célula (Jori et al., 2007; Alves et al., 2013).

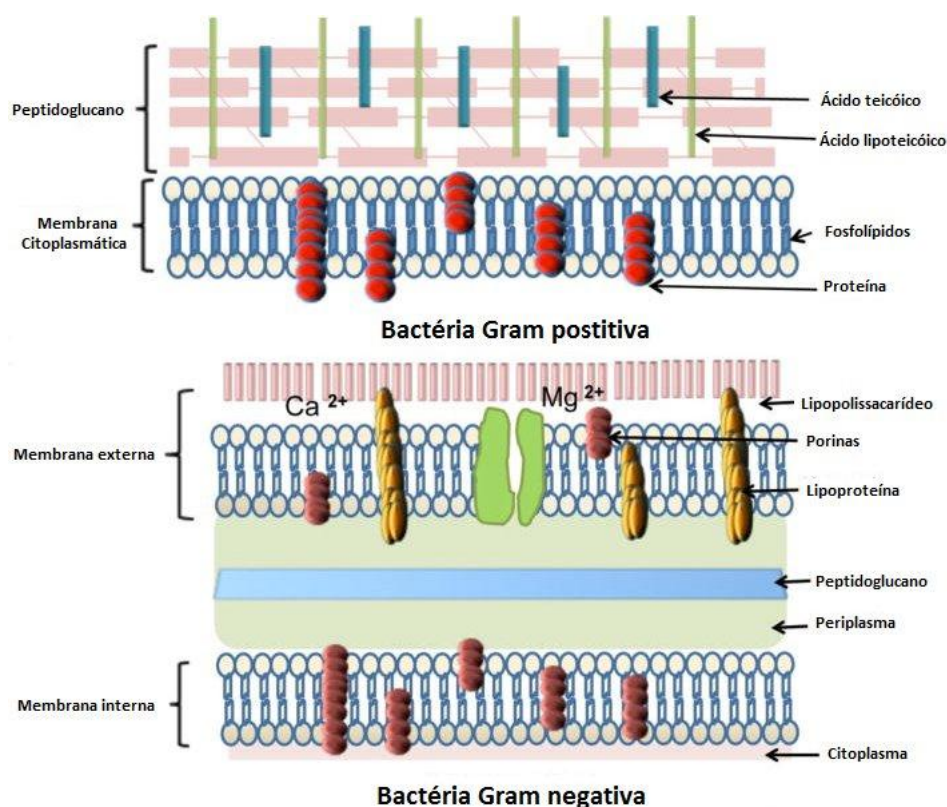


Figura 2. Parede celular de uma bactéria Gram-positiva (em cima) e de uma bactéria Gram-negativa (em baixo) (adaptado de Sharma et al., 2012).

A inativação fotodinâmica de microrganismos pode ter diversas aplicações potenciais, num contexto clínico ou ambiental, contudo este processo encontra-se ainda em fase experimental, tendo sido realizado diversos estudos *in vitro* que demonstram a eficácia deste processo na inativação de microrganismos (Spesia et al. 2010). No entanto, até ao momento, apenas existem alguns estudos *in vivo* (Hamblin et al., 2002; Spesia et al., 2010). Num contexto clínico, tendo em conta que é necessário a aplicação de luz na zona afetada, a PDI apenas poderá ser aplicada no tratamento de infeções localizadas (Hamblin et al., 2004). Alguns exemplos de aplicações clínicas da PDI englobam o tratamento de candidíase oral e de doenças periodontais, bem como a desinfeção de feridas localizadas (Hamblin et al., 2004; Jori et al., 2007). Para além destas aplicações, a PDI também poderá

ser utilizada para esterilização de sangue, de modo a prevenir a contaminação por microrganismos (Spesia et al., 2010). Num contexto ambiental, a PDI pode ser aplicada ao tratamento de águas residuais, representando, neste contexto, uma estratégia eficaz e de baixo impacto ambiental (Almeida et al., 2011).

Em suma, o amplo interesse em relação à PDI deve-se às suas promissoras vantagens, nomeadamente (Sharma et al., 2011):

1. Largo espectro de ação (terapia multialvo), permitindo a destruição de uma grande variedade de microrganismos, nomeadamente bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas, fungos, leveduras e vírus;
2. Baixa probabilidade de aparecimento de microrganismos resistentes, mesmo após vários tratamentos;
3. O FS pode ser desenhado de modo a exibir seletividade para com o microrganismo, não afetando as células e tecidos do hospedeiro;
4. Baixo risco de indução de efeitos mutagénicos;
5. Rápida destruição dos microrganismos, em comparação com os antibióticos. A PDI pode demorar min, ao passo que os antibióticos podem demorar vários dias a destruir os microrganismos na totalidade;
6. A administração tópica do FS, no tratamento de infeções localizadas, é uma vantagem comparativamente com a administração sistémica dos antibióticos pois, desta forma, o FS atinge os microrganismos mais rapidamente;
7. Eficiência na inativação de microrganismos resistentes a antibióticos.

1.4. PROPRIEDADES DOS FOTOSSENSIBILIZADORES

O FS são, geralmente, moléculas aromáticas, naturais ou sintéticas, que contêm um cromóforo central, no qual podem existir substituintes de diversos tipos (Wainwright et al., 2006; Denis et al., 2011). Os FS são, normalmente, moléculas coradas, devido à extensa deslocalização de eletrões que apresentam (Wainwright et al., 2006; Denis et al., 2011). Esta deslocalização significa que a energia necessária para excitar os eletrões da orbital molecular ocupada de energia mais elevada (HOMO, *highest occupied molecular orbital*) para a orbital molecular desocupada de energia mais baixa (LUMO, *lowest unoccupied molecular orbital*) é baixa em comparação com moléculas menos

deslocalizadas e, por conseguinte, as bandas de absorção e região espectral têm comprimentos de onda elevados (região do vermelho), o que reflete a alta probabilidade de excitação (Denis et al., 2011).

Um FS com propriedades ótimas deverá ser dotado de características específicas, para além das características fotofísicas ideais como um elevado rendimento quântico para a geração de oxigénio singuleto, ter um estado tripleto com um longo tempo de vida e ter uma boa capacidade de absorção no comprimento de onda da região espectral em que a fonte de luz emite e uma boa eficiência de geração de espécies reativas de oxigénio (ROS, *reactive oxygen species*) (Wainwright, 2000; De Rosa et al., 2002; Jori et al. 2004). As propriedades ótimas do FS incluem (Jori et al, 2006):

1. Amplo espectro de ação, (o FS deve ter a capacidade de atuar sobre bactérias, fungos e leveduras);
2. Eficácia independente do padrão de resistência a antibióticos da estirpe microbiana;
3. Possibilidade de desenvolver protocolos de PDI que levam a uma extensa redução na população do microrganismo patogénico com danos muito limitados nos tecidos do hospedeiro;
4. Não gerar estirpes resistentes após vários tratamentos;
5. Baixa probabilidade de induzir efeitos mutagénicos;
6. Uso de fontes de luz de baixo custo para a ativação do FS.

Os FS mais comuns em PDI, distribuem-se por várias famílias de compostos heterocíclicos: fenotiazinas (azul de toluidina B, azul de metileno), acridinas, cianinas, merocianinas, macrociclos tetrapirrólicos (porfirinas, clorinas, ftalocianinas), psoralenos (furanocoumarinas), entre outros (Wainwright, 1998). As fenotiazinas, atendendo à sua estrutura e dimensão, intercalam-se nos ácidos nucleicos (Wainwright, 1998). Em *E. coli*, o corante azul de toluidina B aumenta a permeabilidade da membrana, sendo que o azul-de-metileno quebra as cadeias dos ácidos nucleicos (Wainwright, 1998). As acridinas foram descritas pela primeira vez em 1900 como tendo potencial fotossensibilizador, tal como já foi referido anteriormente (Ackroyd et al., 2001). Os mecanismos de ação destes compostos continuam a ser estudados, tendo sido descritos como agentes intercalantes do DNA em fungos e bactérias (Wainwright, 1998). As cianinas resultaram de uma evolução da utilização das acridinas e foram utilizadas como antimicrobianos durante a I Guerra

Mundial. Ainda hoje fazem parte da constituição de muitos medicamentos anti-helmínticos (Wainwright, 1998).

No início dos anos 1990s, descobriu-se que os FS catiónicos são mais eficientes no combate a microrganismos, permitindo também a inativação de bactérias Gram-negativas, leveduras, fungos filamentosos e vírus (Malik et al., 1992; Huang et al. 2012; Alves et al. 2013). Entre os FS catiónicos mais utilizados podem citar-se as porfirinas catiónicas, ftalocianinas catiónicas, bacterioclorinas catiónicas, fenotiazinium catiónico e fluorenos catiónicos (Huang et al., 2010; Denis et al., 2011).

PORFIRINAS

As porfirinas correspondem a moléculas orgânicas com uma estrutura geral de macrociclo tetrapirrólico, formado por quatro anéis pirrólicos ligados entre si por ligações metínicas. Os compostos porfirínicos têm sido amplamente utilizados em tratamentos de PDT e o seu potencial antimicrobiano tem vindo a ser intensamente explorado (Jori, 2004). As porfirinas são compostos importantes em vários processos celulares e na maioria dos casos estão complexadas com iões metálicos, formando metaloporfirinas, uma vez que os quatro átomos de azoto no interior do macrociclo porfirínico podem complexar com catiões metálicos. Alguns exemplos são os grupos heme da hemoglobina, a mioglobina (pigmento respiratório presente nos músculos com a função de armazenar oxigénio), os citocromos, a catalase e a peroxidase (componentes importantes para a defesa biológica contra a toxicidade de oxigénio, removendo espécies reativas, como peróxidos e superóxidos).

INTERCALAÇÃO ENTRE AS PORFIRINAS E O DNA

A intercalação consiste na inclusão reversível de uma molécula (ou grupo), frequentemente denominada de ligando, entre duas moléculas (ou grupos). A intercalação no DNA ocorre pela inserção do ligando entre os pares de bases da molécula (Williams et al., 1992). Para que a intercalação ocorra, é necessário haver desenrolamento (*unwinding*) da cadeia de DNA, de modo a que se forme um espaço entre os pares de bases, no qual se irá inserir o agente intercalante (Williams et al., 1992). O grau de desenrolamento da cadeia de DNA varia consoante o agente intercalante e produz alterações estruturais no DNA, que podem induzir alterações funcionais nesta molécula, designadamente a inibição

da transcrição, replicação e reparação do DNA (Richards et al., 2007). Para além das porfirinas, existem outros agentes intercalantes bem estudados, nomeadamente o brometo de etídio, a berberina e a talidomida (Richards et al., 2007). Os agentes intercalantes no DNA são, por um lado, frequentemente utilizados no tratamento do cancro baseado em quimioterapia, com a função de inibição da replicação do DNA das células tumorais e, por outro lado, também são potenciais agentes mutagénicos (Richards et al., 2007).

Munson et al. (1992) demonstraram que as porfirinas catiónicas interagem com o DNA pelo processo de intercalação. Neste estudo foram utilizadas porfirinas catiónicas meso-substituídas com diferentes cargas, nomeadamente uma porfirina tetracatiónica, uma porfirina tricatiónica e os isómeros *cis* e *trans* das porfirinas dicatiónicas (Munson et al., 1992). Apesar das porfirinas catiónicas formarem complexos com os ácidos nucleicos, produzindo lesões durante o processo de inativação fotodinâmica, de acordo com a literatura, alguns dos danos produzidos na cadeia de DNA podem ser reparados pelos sistemas de reparação do DNA (Camino et al., 2008). Os efeitos da inativação fotodinâmica no DNA já foram estudados, contudo o mecanismo de inativação fotodinâmica ainda não se encontra totalmente elucidado (Camino et al., 2008). Alguns autores concluíram que ainda que os danos do DNA ocorram, provavelmente não constituem a causa primária da fotoinativação da célula bacteriana (Camino et al. 2008; Spesia et al., 2013).

Os vários modos de interação entre o DNA e as porfirinas causam diferentes danos celulares e o espectro de danos do processo de fotossensibilização também é diferente dependendo das características estruturais dos FS (Alves et al., 2013). Os principais fatores descritos que podem interferir com o efeito fotodinâmico nos ácidos nucleicos bacterianos por derivados de porfirina são: a) a estrutura do FS, b) os mecanismos de ação do FS (tipo I e / ou tipo II), c) localização celular do FS; d) ligação do FS a células bacterianas, e) concentração do FS, f) dose de luz, e g) estirpe bacteriana (Alves et al., 2013).

1.5. ALVOS CELULARES DA PDI

Tal como já foi referido anteriormente, a PDI tem a capacidade de provocar danos nos ácidos nucleicos, lípidos e proteínas, sendo, por este motivo designada de terapia multialvo. Em geral, na fotoinativação de bactérias Gram-negativas com recurso a FS

catiônicos, o FS liga-se à parede celular destas bactérias e, depois de excitado pela luz, intervém na produção de espécies reativas de oxigénio que oxidam os diferentes tipos de biomoléculas, produzindo danos ao nível do funcionamento e do metabolismo das células (Jori et al., 2007). Por fim, ocorre inibição do crescimento e morte celular (Jori et al., 2007) (Figura 3).

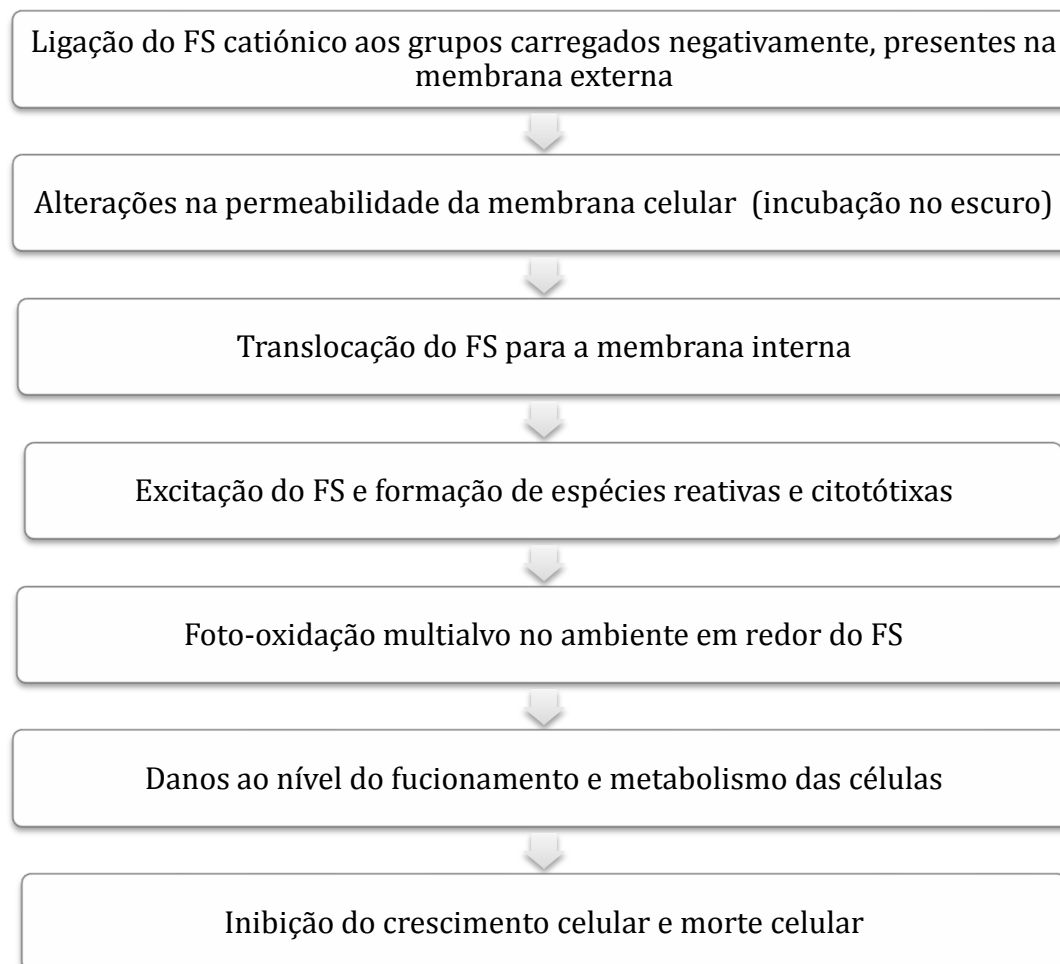


Figura 3. Esquema representativo do mecanismo de PDI, para bactérias Gram-negativas e com recurso a um FS catiónico (adaptado de Jori et al., 2007).

1.5.1. ÁCIDOS NUCLEICOS

Embora existam evidências que demonstram que a PDI pode produzir danos nos ácidos nucleicos, ainda não existe uma conclusão geral que relativa à importância destas biomoléculas enquanto alvos da PDI. Até ao momento, já existem vários estudos que procuraram avaliar a importância destas biomoléculas enquanto alvos da PDI. A metodologia inerente aos estudos do efeito da PDI nos ácidos nucleicos envolve

principalmente a análise de fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose, tendo sido já publicados estudos sobre o efeito de PDI em DNA genómico, DNA plasmídico e RNA (Camino et al., 2008; Spesia et al., 2009; Quiroga et al., 2012; Alves et al., 2013; Spesia et al., 2013). No sentido de compreendermos os vários estudos realizados para estudar os alvos da PDI, segue-se uma descrição detalhada dos principais estudos realizados neste âmbito.

Camino et al. (2008) publicaram um estudo sobre os alvos celulares da PDI de *E. coli*, usando como fotossensibilizadores duas porfirinas catiónicas, uma porfirina tricatiónica anfílica (A_3B^{3+}) e uma porfirina tetracatiónica (TMP^{4+}) (Figura 4) (Camino et al., 2008). O objetivo do estudo foi caracterizar o efeito causado pela PDI ao nível do DNA e da estrutura da membrana (Camino et al., 2008). A estratégia metodológica utilizada envolveu a extração de DNA plasmídico e DNA genómico após o procedimento de PDI, tendo a análise destes ácidos nucleicos sido efetuada por eletroforese em gel de agarose (Camino et al., 2008). De modo a avaliar o efeito direto de PDI no DNA plasmídico, estes autores extraíram DNA plasmídico e dissolveram em tampão TE (10 mM Tri-HCl, 1mM EDTA, pH 7,6) contendo o FS a uma concentração de 1 μ M, irradiaram os tubos por diferentes tempos e efetuaram uma eletroforese em gel de agarose com estas amostras (Camino et al., 2008). Para avaliar o efeito de PDI na membrana, estes autores analisaram as células após PDI, por microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e microscopia eletrónica de transmissão (TEM) (Camino et al., 2008). Por fim, de modo a avaliar a integridade da membrana, determinaram a libertação de conteúdos citoplasmáticos a 260 nm, por espectroscopia (Camino et al., 2008). No que diz respeito ao efeito direto de PDI no DNA plasmídico, Camino et al. (2008) relataram que ambas as porfirinas causaram a conversão de DNA plasmídico da forma I (DNA superenrolado) a DNA plasmídico da forma II (DNA plasmídico relaxado), contudo a fotoclivagem induzida pela porfirina A_3B^{3+} foi mais lenta. No que diz respeito ao DNA plasmídico extraído após PDI, relataram a redução na quantidade de DNA plasmídico ao longo do tempo, com conversão de DNA plasmídico da forma I para a forma II, sendo a porfirina mais eficiente a TMP^{4+} . Relativamente ao DNA genómico extraído após PDI, estes autores relataram a redução da densidade das bandas ao longo do tempo de irradiação e que com a porfirina TMP^{4+} ocorreu um arrastamento (*smearing*) das bandas, o que é indicativo da fotoclivagem de DNA. Relativamente aos efeitos de PDI na ultraestrutura de *E. coli*, estes autores

reportaram alterações na membrana após PDI, detetadas por microscopia de transmissão, contudo, não observaram quaisquer alterações por microscopia de varrimento. Por fim, concluíram que a PDI não induz a libertação de materiais que absorvem a 260 nm, o que sugere que apesar de a funcionalidade da membrana ser afetada, não ocorre libertação de conteúdos citoplasmáticos, logo não ocorre lise celular.

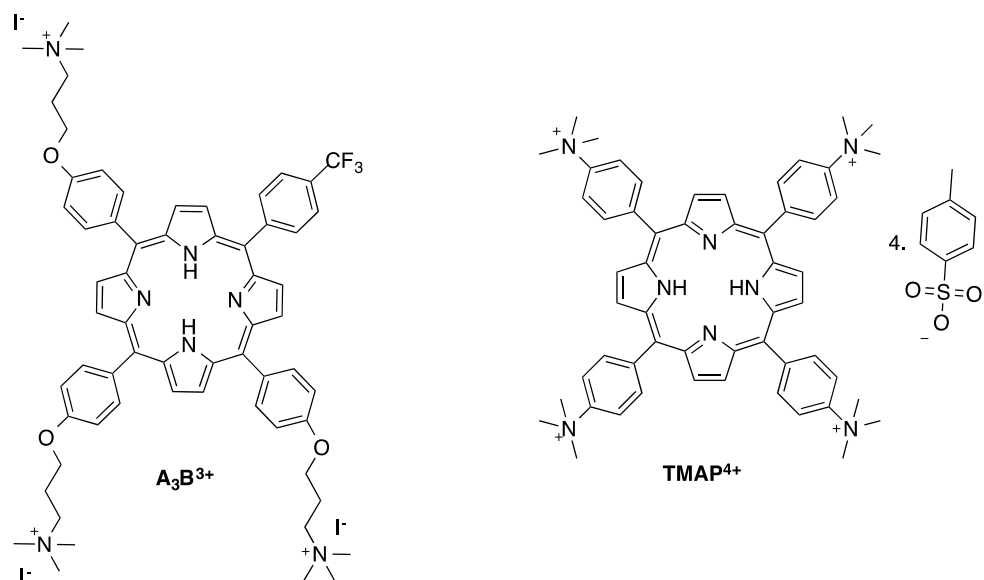


Figura 4. Estruturas das porfrinas A_3B^{3+} e TMP^{4+} .

Spesia et al. (2009) elaboraram um estudo sobre os alvos celulares da PDI de *E. coli* usando como FS um derivado de ftalocianina de zinco tetracatiónica ($ZnPPC^{4+}$) (Spesia et al., 2009). O objetivo deste estudo foi analisar o mecanismo de fotodano, responsável pela morte celular após PDI (Spesia et al., 2009). Para tal, analisaram a fotoclivagem de diferentes tipos de DNA: DNA do timo da vitela; DNA plasmídico de *E. coli* e DNA genómico de *E. coli* (Spesia et al., 2009). Estes autores relataram a fotoclivagem de DNA do timo da vitela ao longo de diferentes tempos de irradiação (1, 2, 3 e 4 horas), traduzida pelo arrastamento (*smearing*) das bandas de DNA genómico numa eletroforese em gel de agarose. Para o DNA plasmídico verificaram que ocorreu a conversão de DNA plasmídico superenrolado (forma I) a DNA plasmídico circular relaxado (forma II) e finalmente, para o DNA genómico, verificaram que não ocorreu clivagem do DNA (Figura 5).

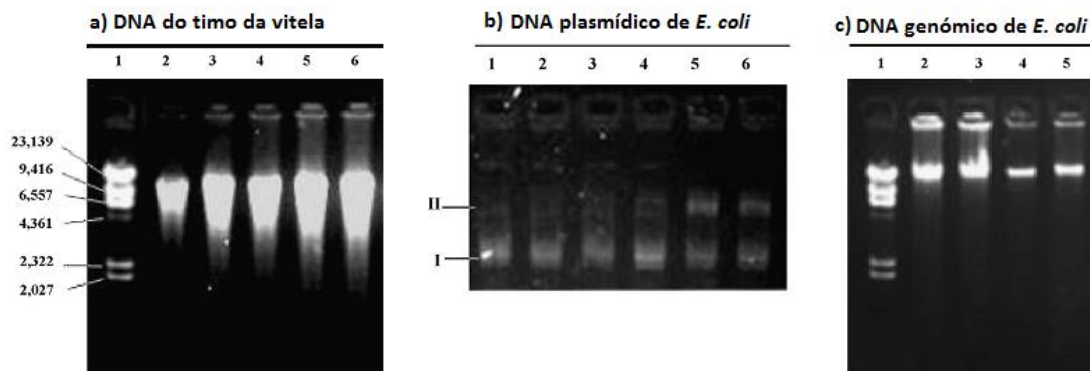


Figura 5. Efeito da inativação fotodinâmica em diferentes tipos de DNA analisados por eletroforese em gel de agarose, após diferentes tempos de irradiação. a) amostra de DNA do timo da vitela irradiadas durante 1, 2, 3 e 4 horas (colunas 3-6, respetivamente), a coluna 1 é o marcador de pesos moleculares e a coluna 2 é o controlo escuro; b) conversão de DNA plasmídico da forma I para a forma II após 5, 10, 20, 60 e 90 min de irradiação (colunas 2-6, respetivamente), a coluna 1 é o controlo escuro; c) amostra de DNA genómico de *E. coli* extraído após inativação fotodinâmica durante 0.5, 1 e 4 horas (colunas 3-5, respetivamente), a coluna 1 corresponde ao marcador de pesos moleculares e a coluna 2 corresponde ao controlo escuro (Spesia et al., 2009).

Para além da análise dos efeitos da PDI nos ácidos nucleicos de *E. coli*, por eletroforese em gel de agarose, Spesia et al., 2009 avaliaram a integridade e permeabilização da parede celular de *E. coli* por espectroscopia (Spesia et al., 2009). A parede celular é um alvo importante dos agentes antimicrobianos e os danos causados nestas estruturas biológicas são inicialmente acompanhado da libertação de espécies de baixo peso molecular seguido da libertação de nucleótidos de DNA e RNA, entre outros materiais (Spesia et al., 2009). A libertação destes componentes intracelulares pode ser identificada através da leitura da absorção a 260 nm, uma vez que o dano na parede celular é acompanhado de uma forte absorção a este comprimento de onda (Spesia et al., 2009).

Spesia et al. (2013) estudaram o mecanismo de PDI na bactéria Gram positiva *Streptococcus mitis*, usando como FS uma ftalocianina de zinco tetracatiónica (ZnEPc^{4+}). Neste estudo, investigaram o efeito fotodinâmico em DNA de timo de vitela, através de dois métodos diferentes: a determinação da constante de ligação do FS ao DNA (K_{DNA}) e a irradiação deste DNA dissolvido em tampão TE contendo o FS a uma concentração de 20 μM . Relativamente ao estudo do efeito da PDI nas células de *S. mitis*, a concentração do FS foi de 2 μM . Neste estudo, as células bacterianas (*S. mitis*) foram analisadas, após PDI, por TEM e SEM, tendo sido efetuada a determinação da libertação de conteúdos

citoplasmáticos por espectroscopia. A análise do DNA genômico, após PDI, foi efetuada por eletroforese em gel de agarose. Os autores observaram, após análise das células por TEM, que as células sujeitas a PDI apresentavam estruturas multilamelares semelhantes a mesossomas, ao contrário das células não tratadas. Para além disto, estes autores relataram uma diminuição na eletrodensidade do citoplasma e alterações na espessura da parede celular células, nas células sujeitas a PDI. Após análise das células de *S. mitis* por SEM, os autores verificaram a presença de bolhas de várias formas na superfície da célula bacteriana. De acordo com este estudo, não ocorreu lise celular após PDI. No que diz respeito ao DNA, estes autores concluíram que, apesar de a interação entre o DNA do timo de vitela e o FS ter sido evidente, não ocorreu fotoclivagem significativa no DNA genômico bacteriano, após PDI.

Alves et al. (2013) publicaram um estudo sobre os efeitos *in vivo* da PDI nos ácidos nucleicos de duas bactérias, *E. coli* (bactéria Gram-negativa) e *Staphylococcus warneri* (bactéria Gram-positiva). Os FS utilizados por estes autores foram duas porfirinas catiónicas (Tetra-Py⁺-Me) e (Tri-Py⁺-Me-PF). A estratégia metodológica utilizada por estes autores para avaliarem os efeitos de PDI nos ácidos nucleicos envolveu a extração de ácidos nucleicos após PDI, sendo que o dsDNA foi quantificado por fluorimetria e os fragmentos de ácidos nucleicos foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Estes autores relataram cinéticas de fotoinativação celular muito diferentes para cada um destes FS, sendo a cinética de inativação para a porfirina Tri-Py⁺-Me-PF muito superior comparativamente com a porfirina Tetra-Py⁺-Me. Para além disto, estes autores também analisaram a ligação destas porfirinas às células de cada uma das bactérias e verificaram que, a ligação da porfirina Tri-Py⁺-Me-PF às células de *E. coli*, sem lavagem, foi superior à ligação da porfirina Tetra-Py⁺-Me, contudo, para a bactéria *S. warneri* observaram o inverso, ou seja, a ligação da porfirina Tetra-Py⁺-Me às células desta bactéria revelou-se superior à ligação observada para a porfirina Tri-Py⁺-Me-PF. Estes autores estabeleceram uma comparação entre o decréscimo da concentração de DNA e a inativação das células e verificaram que para a bactéria *E. coli*, estes parâmetros são diretamente proporcionais, sendo que a porfirina Tri-Py⁺-Me-PF demonstrou maior eficácia de inativação comparativamente com a porfirina Tetra-Py⁺-Me. Neste estudo, para a bactéria *E. coli* relataram uma redução na densidade das bandas dos ácidos nucleicos ao longo do tempo, sendo que para a porfirina Tri-Py⁺-Me-PF estas reduções foram mais drásticas; para a

bactéria *S. warneri* relataram drásticas reduções no DNA genómico bacteriano após 5 min de irradiação com a porfirina Tri-Py⁺-Me-PF, contudo, para a porfirina Tetra-Py⁺-Me observaram bandas de DNA genómico bacteriano ao longo dos 40 min de irradiação. Em suma, o FS mais eficiente foi a porfirina Tri-Py⁺-Me-PF, contudo, ambos os FS foram eficazes na PDI de ambas as bactérias. Estes autores concluíram que, em *E. coli*, ocorreram reduções significativas nos ácidos nucleicos ao longo do tempo, sendo que os efeitos foram superiores no rRNA 23S, seguindo-se o rRNA 16S e por último o DNA genómico bacteriano, ou seja, estabeleceram que os efeitos da PDI no rRNA precediam os efeitos no DNA genómico bacteriano. Assim, estabeleceram que os resultados obtidos, relativamente ao RNA, podem dever-se ao efeito direto do oxigénio singuleto no DNA ou ao efeito indireto na maquinaria de transcrição, causando um decréscimo significativo na concentração de RNA.

Na Tabela 1 estão representadas as principais condições experimentais dos estudos, descritos anteriormente, relativos ao efeito de PDI nos ácidos nucleicos de bactérias.

Tabela 1. Condições experimentais de vários estudos relativos ao mecanismo de PDI em bactérias e efeitos no DNA. A – ácido nucleico analisado no estudo; NA – ácido nucleico não analisado; S – sim; N – não.

Estudo		Alves et al., 2013	Spesia et al., 2013	Spesia et al., 2009	Camino et al., 2008
Bactéria		<i>E. coli</i>	<i>S. mitis</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
		<i>S. warneri</i>			
Tipo de DNA	DNA genómico bacteriano	A	A	A	A
	DNA plasmídico	NA	NA	A	A
	RNA ribossomal bacteriano	A	NA	NA	NA
	DNA de timo de vitela	NA	A	A	NA
Efeito no DNA	Fotoclivagem do DNA genómico bacteriano	N	N	N	N
	Diminuição da quantidade de DNA genómico bacteriano	S	NA	NA	NA
	Fotoclivagem do DNA de timo de vitela	-	S	S	-
	Conversão do DNA plasmídico (Forma I – Forma II)	-	-	S	S
	FS	Porfirinas catiónicas	Ftalocianina catiónica	Ftalocianina catiónica	Porfirinas catiónicas
Concentração do FS (μM)		5	2 20	2 20	1
Irradiância (W m ⁻²)		40	300	300	1296
Dose de luz máxima (J cm ⁻²)		64,8	432	432	900
Tempo máximo de irradiação (h)		4,5	4	4	4

1.6. OBJETIVO DO TRABALHO

Neste trabalho, pretende-se estudar o efeito fotodinâmico nos ácidos nucleicos de *E. coli*, usando dois FS catiónicos, a tetra-iodeto de 5,10,15,20-tetraquis(1-metilpiridínio-4-il)porfirina (Tetra-Py⁺-Me) e a tri-iodeto de 5,10,15-(1-metilpiridínio-4-il)-20-(pentafluorofenil)porfirina (Tri-Py⁺-Me-PF). Para este efeito, recorreu-se a duas abordagens metodológicas diferentes. No primeiro caso, procedeu-se à fotoinativação de células de *E. coli* em diferentes períodos de tempo e extraíram-se os ácidos nucleicos subsequentemente. No segundo caso, os ácidos nucleicos foram extraídos de células de *E. coli* e irradiados posteriormente na presença de cada um dos FS. As condições experimentais selecionadas neste trabalho (concentração bacteriana, concentração de FS e dose de luz) foram as mesmas para as duas abordagens metodológicas. Em ambas as abordagens metodológicas, os ácidos nucleicos foram analisados por eletroforese em gel de agarose e quantificados por fluorometria.

CAPÍTULO 2 - MÉTODOS

2.1. FOTOSSENSIBILIZADORES

Os FS utilizados neste trabalho foram a Tetra-iodeto de 5,10,15,20-tetraquis(1-metilpiridínio-4-il) porfirina (Tetra-Py⁺-Me) e a Tri-iodeto de 5,10,15-(1-metilpiridínio-4-il)-20-(pentafluorofenil) porfirina (Tri-Py⁺-Me-PF). Estes FS foram sintetizados no Departamento de Química da Universidade de Aveiro. A porfirina Tetra-Py⁺-Me é um fotossensibilizador de uso generalizado, enquanto a porfirina Tri-Py⁺-Me-PF é um composto preparado pelo grupo de química orgânica da Universidade de Aveiro. As estruturas químicas destas porfirinas estão representadas na Figura 6.

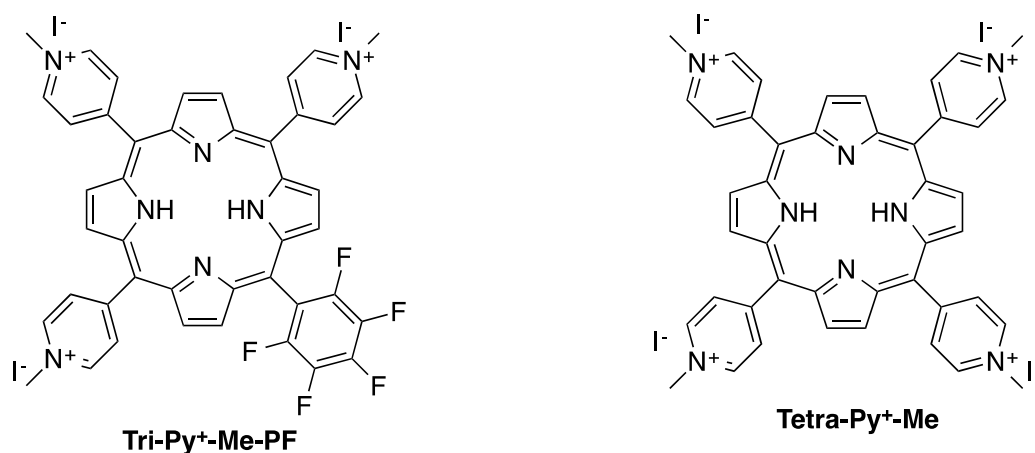


Figura 6. Estruturas químicas dos fotossensibilizadores utilizados neste trabalho.

2.2. ESTIRPES BACTERIANAS E PREPARAÇÃO DAS CULTURAS

A estirpe bacteriana de *E. coli* ATCC 13706 foi armazenada a 4 °C, em meio de cultura TSA, *tryptic soy agar*, (Merck). Antes de cada ensaio, foi inoculada, assepticamente, uma colónia desta bactéria em 15 mL de meio de cultura TSB, *tryptic soy broth* (Merck) e incubada durante 16 horas a 37 °C. Após o período de incubação, transferiu-se uma alíquota desta cultura (240 µL) para 30 mL de meio TSB, em condições de assepsia, e incubou-se novamente durante 16 h a 37 °C de modo a obter-se uma densidade ótica (DO600) de ≈ 1.6 , o que corresponde a $\approx 10^8$ células mL⁻¹.

2.3. EFEITO INDIRETO

Para analisar os efeitos do processo de inativação fotodinâmica nos ácidos nucleicos, foi seguido o método de Alves, Faustino et al. 2013. Foram centrifugados 3 mL

de cultura celular, de modo a obter-se um pellet de células, efetuando-se duas lavagens do mesmo com 1 mL de tampão fosfato salino (PBS, *phosphate buffered saline*), pH 7.4. As centrifugações foram executadas em microtubos de 2 mL, à temperatura ambiente durante 10 min a $13.000 \times g$, na microcentrífuga Heraeus® Pico™ 17 (Thermo Scientific). O pellet foi depois ressuspensão em 1 mL de PBS. As suspensões bacterianas obtidas anteriormente (1 mL) foram transferidas assepticamente para copos de vidro de 100 mL, contendo 8,9 mL de PBS. Subsequentemente, adicionou-se 100 µL do FS a partir de uma solução stock (500 µM em dimetilsulfóxido, DMSO), com uma concentração final de 5,0 µM. Após a adição do volume adequado de FS, os copos foram envolvidos em papel de alumínio de modo a evitar exposição acidental à luz e efetuou-se uma pré-incubação de 10 min à temperatura ambiente, com uma agitação de 100 rpm.

Foram realizados dois controlos (controlo claro e controlo escuro) em simultâneo: o controlo claro (CC) corresponde a uma suspensão bacteriana, exposta à luz sem adição de FS e o controlo escuro (CE) corresponde a uma suspensão bacteriana incubada com FS (5.0 µM) protegida da luz com papel de alumínio. Tal como as amostras, os controlos também foram submetidos à pré-incubação de 10 min, acima referida.

Este protocolo de fotossensibilização foi usado para os dois FS testados, tendo cada ensaio sido repetido separadamente três vezes.

2.4. CONDIÇÕES DE IRRADIAÇÃO

Após o período de pré-incubação, todas as amostras foram expostas, em paralelo, a um sistema de luz branca (radiação PAR, 13 lâmpadas OSRAM 2' de 18 W cada, 380-700 nm) com uma irradiância de 40 W m^{-2} , à temperatura ambiente durante 270 min, com agitação mecânica de 100 rpm.

2.5. EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Procedeu-se à extração dos ácidos nucleicos das células colhidas por centrifugação após os diferentes tempos de fotossensibilização, segundo o método descrito por Alves, Faustino et al. 2013. Este método permite a extração de DNA, tendo sido adaptado, de modo a obter-se também RNA.

Os pellets bacterianos, obtidos por centrifugação, foram ressuspensos em 100 µL de tampão TE 1x (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH=8.0). Adicionaram-se 20 µL de solução de lisozima (30 mg mL^{-1}) e incubou-se durante 1 h a 37 °C. Após incubação, adicionaram-

se 50 µL de solução de lise (Genomic DNA Purification Kit, Fermentas) e incubou-se a 65 °C durante 10 min. Adicionaram-se 40 µL de solução de SDS a 25% e incubou-se novamente a 68 °C durante 10 min. Posteriormente, adicionaram-se 50 µL de solução de NaCl de concentração 5 M, agitaram-se as amostras no vórtex durante 2 min, à velocidade máxima e incubaram-se a 68 °C durante 5 min. As amostras foram novamente agitadas no vórtex durante 2 min, à velocidade máxima. Adicionaram-se 200 µL de clorofórmio, misturou-se bem por inversão e centrifugou-se a 13.000 x g durante 10 min. A fase aquosa, a qual contém os ácidos nucleicos, foi cuidadosamente transferida para um novo microtubo de 2 mL estéril, ao qual se adicionaram 100 µL de isopropanol de modo a precipitar-se os ácidos nucleicos e incubou-se a 4°C durante 10 min. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 13.000 x g durante 5 min e o sobrenadante foi cuidadosamente descartado. Procedeu-se à adição de 100 µL de etanol absoluto, misturou-se bem por inversão e incubou-se a 4 °C durante 15 min. Após centrifugar durante 5 min, descartou-se o sobrenadante, adicionaram-se 100 µL de etanol a 70% ao pellet de ácidos nucleicos e incubou-se durante 1 min à temperatura ambiente. Procedeu-se a uma nova centrifugação a 13.000 x g durante 3 min e descartou-se o sobrenadante. Centrifugaram-se os tubos durante 10 seg de modo a permitir que o resíduo de etanol se acumulasse no fundo dos tubos. Com o auxílio da micropipeta, removeu-se este resíduo. Após total secagem do *pellet*, procedeu-se à sua dissolução em tampão TE. As amostras de ácidos nucleicos foram armazenadas a -80 °C.

2.6. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Efetuiu-se a corrida das amostras de ácidos nucleicos em gel de agarose a 0.8%, preparada em tampão TAE (TAE 1X: 0.04 M Tris-Acetate, 0.001 M EDTA, pH 8.0). O gel de agarose foi corado com GelRedTM (10.000X in water, Biotium). Para carregar as amostras no gel, misturou-se 5 µL de amostras de ácidos nucleicos com 3 µL de tampão de carga. O marcador de pesos moleculares utilizado foi o DNA Ladder XXL WideRange (GeneOn), com fragmentos com tamanhos compreendidos (em pares de bases) entre 0,25 Kb e 25 Kb (Figura 7). As imagens dos géis foram obtidas com recurso ao software Image LabTM (Bio-Rad).

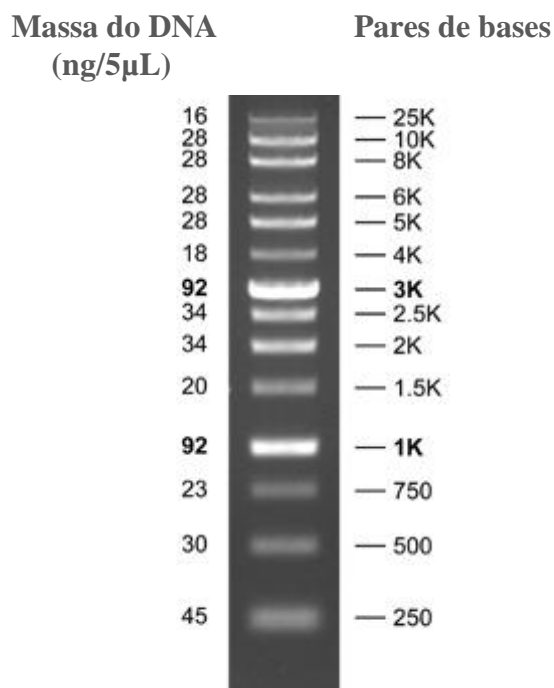


Figura 7. Perfil eletroforético do marcador de pesos moleculares utilizado neste trabalho, num gel de agarose a 7%.

2.7. QUANTIFICAÇÃO DE DNA

A concentração do DNA de cadeia dupla (dsDNA) nas amostras de ácidos nucleicos, foi determinada por fluorimetria com recurso ao fluorómetro Qubit® fluorometer (Invitrogen) e ao kit de quantificação Qubit™ dsDNA HS Assay Kit Q32851 (Invitrogen).

Antes de cada ensaio de quantificação, procedeu-se a uma calibração, com recurso aos padrões fornecidos no kit de quantificação. Para quantificar o dsDNA, preparou-se a solução de trabalho, diluindo o reagente Qubit™ dsDNA HS de 1:200 em tampão Qubit™ dsDNA HS, num tubo de plástico estéril.

Pipetou-se 190 μL de solução de trabalho para cada um dos tubos dos padrões, adicionou-se 10 μL de cada padrão ao respetivo tubo e agitou-se no vórtex durante 2-3 segundos, tendo o cuidado de não permitir a formação de bolhas. Incubaram-se os tubos dos padrões durante 2 min à temperatura ambiente e efetuou-se a calibração.

De modo a quantificar o dsDNA nas amostras, adicionou-se 198 μL de solução de trabalho e adicionou-se 2 μL de cada uma das amostras aos respetivos tubos, devidamente identificados. Misturou-se esta solução, agitando no vórtex durante 2 a 3 s. Incubaram-se

os tubos durante 2 min à temperatura ambiente e procedeu-se à leitura da concentração da amostra.

A concentração de DNA na amostra foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Concentração da amostra (ng/mL)} = \text{valor QF} \times \left(\frac{200}{x}\right)$$

Onde:

Valor QF = valor obtido no Qubit® 2.0 Fluorometer

x = número de microlitros de amostra adicionados ao tubo

2.8. EFEITO DIRETO

Este método foi adaptado de Caminos, Spesia et al. 2008. Procedeu-se à extração de ácidos nucleicos a partir de 500 μ L de amostra de *E. coli*, em microtubos de 2 mL. O procedimento de extração foi executado de acordo com Alves, Faustino et al. 2013. No final do procedimento de extração, o *pellet* de ácidos nucleicos foi dissolvido em 20 μ L de tampão TE contendo o FS a uma concentração de 5 μ M. Foram efetuados três controlos por cada ensaio, o controlo das células (C), o controlo claro (CC) e o controlo escuro (CE). O controlo das células refere-se aos ácidos nucleicos não irradiados (os ácidos nucleicos foram dissolvidos em tampão TE sem FS); o controlo claro corresponde aos ácidos nucleicos dissolvidos em TE sem FS e foi irradiado durante 270 min; o controlo escuro corresponde aos ácidos nucleicos dissolvidos em TE com FS, irradiado durante 270 min mas protegido da luz (o tubo foi envolvido com papel de alumínio de modo a evitar entrada de luz).

Efetuuou-se uma pré-incubação no escuro de 10 min à temperatura ambiente, a 100 rpm. Após o período de pré-incubação, as amostras e o controlo claro (CC) foram irradiadas e o controlo escuro (CE) foi incubado nas mesmas condições mas protegido da luz (envolvido em papel de alumínio) e com a tampa fechada durante os 270 min. Os ácidos nucleicos foram quantificados por fluorimetria e analisados por eletroforese em gel de agarose.

CAPÍTULO 3 - RESULTADOS

3.1. INTERPRETAÇÃO DOS PERFIS ELETROFORÉTICOS OBTIDOS

3.1.1. EFEITO INDIRETO

Nos perfis eletroforéticos apresentados em baixo, a letra M designa o marcador de pesos moleculares, a letra C representa o controlo das células (ácidos nucleicos extraídos de células de *E. coli* que não foram sujeitos ao processo de PDI); a sigla CC refere-se ao controlo claro (suspensão de *E. coli*, sem FS e irradiada durante 270 min); a sigla CE refere-se ao controlo escuro (suspensão de *E. coli* contendo FS mas protegido da luz durante os 270 min de irradiação). As colunas numeradas de 1 a 6 contêm as amostras irradiadas por 0, 30, 60, 90, 180 e 270 min, respetivamente. A banda de maior peso molecular (cerca de 25 Kb) corresponde ao DNA genómico de *E. coli* e as bandas de menor peso molecular correspondem ao RNA ribossomal desta bactéria, rRNA 23S e rRNA 16S.

Os perfis eletroforéticos (Figura 8) obtidos para os ácidos nucleicos extraídos das células de *E. coli* após o processo de PDI, no qual as células foram irradiadas até 270 min, com uma concentração de FS de 5.0 μM mostram uma diminuição na quantidade de DNA genómico ao longo do tempo de irradiação (colunas 1 – 6, amostras irradiadas por 0, 30, 60, 90, 180 e 270 min, respetivamente), uma vez que a intensidade das bandas vai diminuindo ao longo do tempo. No caso da porfirina Tri-Py⁺-Me-PF (lado esquerdo), verificou-se uma diminuição significativa na quantidade de DNA genómico nos tempos 30 min e 60 min (colunas 2 e 3, respetivamente) e, no tempo 90 min, não foram detetadas bandas de DNA genómico.

No que diz respeito à porfirina Tetra-Py⁺-Me (lado direito), verifica-se uma diminuição significativa na quantidade de DNA nas bandas referentes aos tempos 30 min, 60 min e 90 min (colunas 2, 3 e 4). Verifica-se, portanto, que em contraste com o que se verificou com a porfirina Tri-Py⁺-Me-PF, para a qual não se detetou DNA a partir do tempo 90 min, no caso da porfirina Tetra-Py⁺-Me, foi possível detetar DNA no tempo 90 min. Para ambas as porfirinas, as bandas de DNA genómico apresentadas na Figura 9 indicam que não ocorreu fotoclivagem do DNA, uma vez que não se verifica um arrastamento (*smearing*) nas mesmas. Para a porfirina Tri-Py⁺-Me-PF, para a qual foi possível visualizar os rRNA 23S e 16S, verifica-se que estas bandas são mais ténues no controlo claro (CC), em comparação com o controlo das células (C) e com o controlo escuro (CE). Verifica-se, ainda, que as bandas de rRNA estão ausentes no tempo 60 min.

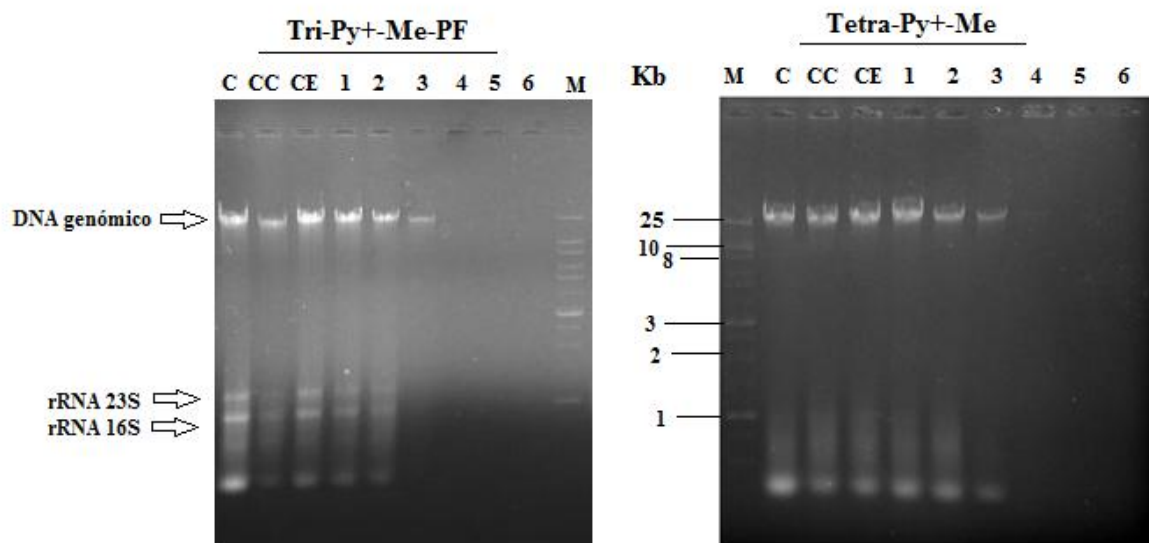


Figura 8. Perfis eletroforéticos referentes aos ácidos nucleicos extraídos das células de *E. coli* após PDI. As células foram incubadas durante 10 min no escuro com o fotossensibilizador a uma concentração de 5 μM e foram irradiadas com luz visível durante 0, 30, 60, 90, 180 e 270 min (colunas 1 a 6 respetivamente). C: controlo das células (ácidos nucleicos extraídos de células de *E. coli* não irradiadas); CC: controlo claro (suspensão de *E. coli* sem fotossensibilizador irradiada durante 270 min); CE: controlo escuro (suspensão de *E. coli* com fotossensibilizador a 5.0 μM irradiada durante 270 min no escuro).

As Figuras 9 e 10 referem-se aos gráficos da variação da concentração de dsDNA, expressa em ng mL^{-1} , ao longo do tempo (min), para as porfirinas Tri-Py⁺-Me-PF e Tetra-Py⁺-Me, respetivamente, suportando os resultados observados no gel de agarose. Na Figura 9, referente ao gráfico da variação da concentração de dsDNA ao longo do tempo, para a porfirina Tri-Py⁺-Me-PF, verifica-se que ocorre uma redução brusca da concentração de dsDNA entre o tempo 0 e o tempo 60 min, sendo que para a porfirina Tetra-Py⁺-Me (Figura 10), dá-se uma redução significativa na concentração de dsDNA entre os tempos 0 e 90 min.

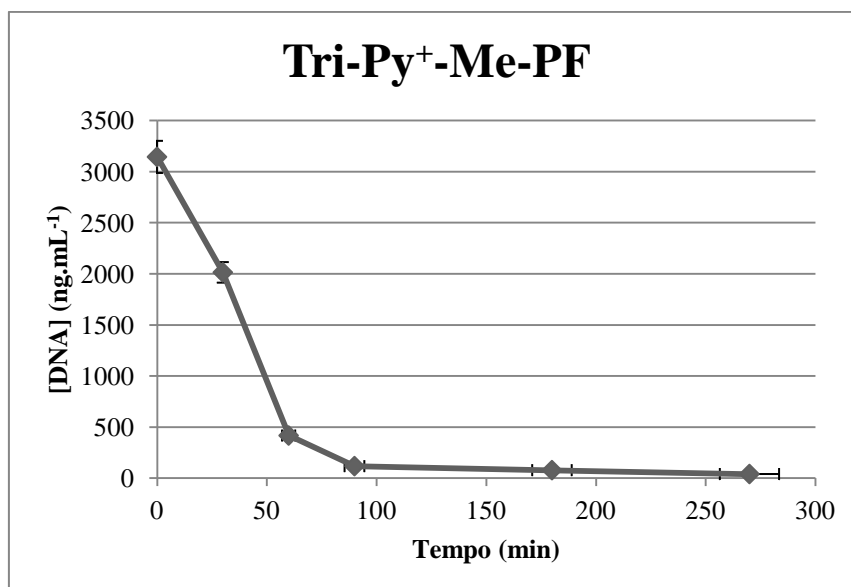


Figura 9. Variação da concentração de DNA (ng.mL⁻¹) ao longo dos diferentes tempos de fotoinativação (min), usando como fotossensibilizador a porfirina Tri-Py⁺-Me-PF.

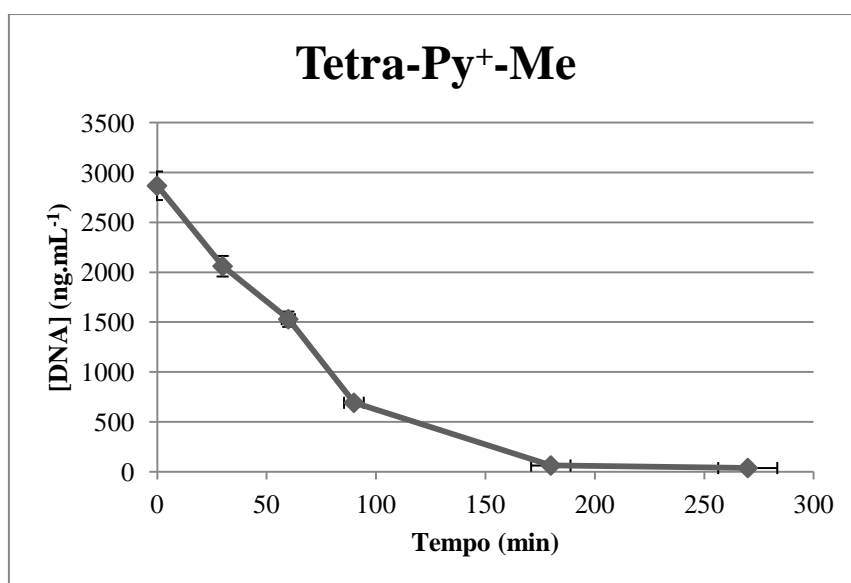


Figura 10. Variação da concentração de DNA (ng.mL⁻¹) ao longo dos diferentes tempos de fotoinativação (min), usando como fotossensibilizador a porfirina Tetra-Py⁺-Me.

3.1.2. EFEITO DIRETO

Na Figura 11 estão representados os perfis eletroforéticos obtidos para os ácidos nucleicos extraídos das células de *E. coli* e irradiados posteriormente, por um período máximo de 270 min, com uma concentração de FS de 5,0 μ M. O perfil eletroforético representado do lado esquerdo corresponde à porfirina Tri-Py⁺-Me-PF e do lado direito

está o perfil eletroforético referente à porfirina Tetra-Py⁺-Me. Na Figura 11, a letra M designa o marcador de pesos moleculares, a letra C representa o controlo das células (ácidos nucleicos extraídos de células e que não foram sujeitos ao processo de PDI); a sigla CC refere-se ao controlo claro (ácidos nucleicos dissolvidos em tampão TE, sem FS e irradiados durante 270 min); a sigla CE refere-se ao controlo escuro (ácidos nucleicos contendo o FS mas protegido da luz durante os 270 min de irradiação). As colunas numeradas de 1 a 6 contêm as amostras irradiadas por 0, 30, 60, 90, 180 e 270 min respetivamente. A banda de maior peso molecular (cerca de 25 Kb) corresponde ao DNA genómico de *E. coli* e as bandas de menor peso molecular correspondem ao RNA ribossomal desta bactéria, rRNA 23S e rRNA 16S.

Verifica-se que as bandas de DNA genómico mantêm densidades idênticas ao longo do tempo, para ambas as porfirinas, não se verificando fotoclivagem significativa do DNA. Para a porfirina Tri-Py⁺-Me-PF, verifica-se que a densidade das bandas correspondentes aos rRNAs diminui ao longo do tempo, sendo que no tempo 90 min (coluna 4), estas bandas não são detetadas. Para a porfirina Tetra-Py⁺-Me, observa-se uma diminuição na densidade nas bandas de rRNA ao longo do tempo, sendo que estas bandas não são detetadas 60, 90 e 180 min, estando presentes no tempo 270 min.

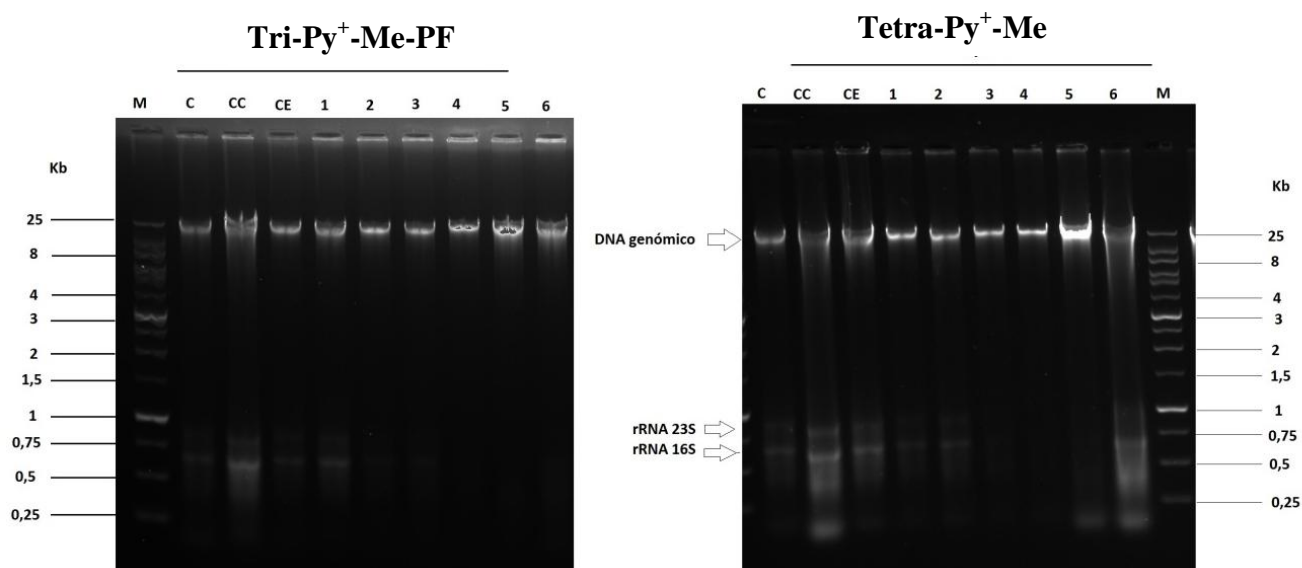


Figura 11. Perfis eletroforéticos referentes aos ácidos nucleicos extraídos das células de *E. coli* e posteriormente sujeitos a PDI. Os ácidos nucleicos foram incubados durante 10 min no escuro com o fotossensibilizador a uma concentração de 5 µM e foram irradiados com luz visível durante 0, 30, 60, 90, 180 e 270 min (colunas 1 a 6 respetivamente). C: controlo das células (ácidos nucleicos extraídos de células de *E. coli*, não irradiados); CC: controlo claro (ácidos nucleicos de *E. coli* sem fotossensibilizador irradiados durante 270 min); CE: controlo escuro (ácidos nucleicos de *E. coli* com fotossensibilizador a 5.0 µM incubados durante 270 min no escuro).

3.2. DECRÉSCIMO DE dsDNA E O DECRÉSCIMO DE CÉLULAS - COMPARAÇÃO

Nas Tabela 2 e 3, encontram-se representados os decréscimos na concentração de dsDNA ao longo do tempo, calculados em percentagem, para os dois FS utilizados neste trabalho, Tri-Py⁺-Me-PF (Tabela 2) e Tetra-Py⁺-Me (Tabela 3), respetivamente. Nestas tabelas, o efeito direto designa o decréscimo da concentração de dsDNA referente às amostras de ácidos nucleicos extraídos de *E. coli* e posteriormente irradiados na presença do FS e o efeito indireto refere-se ao decréscimo da concentração de dsDNA extraído das células de *E. coli* após o processo de PDI. O cálculo do decréscimo de DNA foi efetuado para a média das concentrações de dsDNA dos três ensaios, em relação à concentração de dsDNA obtida no tempo 0 min. Para além dos valores do decréscimo da concentração de dsDNA, nas Tabelas 2 e 3, constam também as correspondentes inativações celulares ao longo do tempo (Alves et al., 2013).

Para a porfirina Tri-Py⁺-Me-PF (Tabela 2), o decréscimo de DNA no tempo 30 min foi 4,9% para o efeito direto e 51% para o efeito indireto. No tempo 60 min, o decréscimo de DNA, para o efeito direto, foi 11,9% e para o efeito indireto foi 90,3%. Relativamente ao tempo 90 min, o decréscimo de DNA foi 11,7% e 98,5% para o efeito direto e indireto, respetivamente. No tempo 180 min, obteve-se um decréscimo de DNA de 13,2% para o efeito direto e 98,7% para o efeito indireto. Finalmente, para o tempo 270 min, o decréscimo de DNA, para o efeito direto foi 6,2 % e, para o efeito indireto, foi 99,4%. O decréscimo de DNA, para o efeito indireto, foi diretamente proporcional à inativação celular, ou seja, ao longo do tempo, quanto maior o decréscimo de dsDNA, maior o decréscimo de células.

Tabela 2. Decréscimo da concentração de dsDNA (%) ao longo do tempo e inativação celular de *E. coli* (log UFC mL⁻¹), obtidos após tratamento fotodinâmico com a porfirina Tri-Py⁺-Me-PF (5,0 µM). Os decréscimos da concentração de dsDNA foram calculados em relação ao valor obtido no tempo 0 min e referem-se às médias dos três ensaios independentes executados para cada caso.

Tempo de irradiação (min)	Dose de luz (J cm ⁻²)	Tri-Py ⁺ -Me-PF				Inativação celular (log UFC mL ⁻¹)*
		Decréscimo de [DNA] (%)				
		Efeito direto		Efeito indireto		
		Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
0	0	0	0	0	0	0
30	7,2	4,9	3,3	51,0	8,2	5,2
60	14,4	11,9	0,9	90,3	3,4	5,4
90	21,6	11,7	3,3	98,5	1,0	5,8
180	43,2	13,2	9,3	98,7	0,1	7,2
270	64,8	6,2	5,2	99,4	0,4	7,7

*Dados de Alves et al., 2013

Para a porfirina Tetra-Py⁺-Me (Tabela 3), o decréscimo na concentração de DNA, no tempo 30 min, foi 1,4%, para o efeito direto e 36,1% para o efeito indireto. No tempo seguinte (60 min), obteve-se um decréscimo de DNA de 13,1% para o efeito direto e de 61,9% para o efeito indireto. Nos tempos 90, 180 e 270 min, o decréscimo de DNA, para o efeito direto, foi 0% e, para o efeito indireto foi 75,3%, 98,1% e 98,9%, respetivamente. O decréscimo de DNA, para o efeito indireto, foi diretamente proporcional à inativação celular.

Tabela 3. Decréscimo da concentração de dsDNA (%) ao longo do tempo e inativação celular de *E. coli* (log UFC mL⁻¹), obtidos após tratamento fotodinâmico com a porfirina Tetra-Py⁺-Me (5,0 µM). Os decréscimos da concentração de dsDNA foram calculados em relação ao valor obtido no tempo 0 min e referem-se às médias dos três ensaios independentes.

Tempo de irradiação (min)	Dose de luz (J cm ⁻²)	Tri-Py ⁺ -Me				Inativação celular (log UFC mL ⁻¹)*
		Decréscimo de [DNA] (%)				
		Efeito direto		Efeito indireto		
		Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
0	0	0	0	0	0	0
30	7,2	1,4	0,5	36,1	0,69	2,9
60	14,4	13,1	3,5	61,9	1,18	4,4
90	21,6	0	0	75,3	2,65	5,7
180	43,2	0	0	98,1	0,26	6,1
270	64,8	0	0	98,9	0,30	6,2

*Dados de Alves et al., 2013

3.3. EFICIÊNCIA DE INATIVAÇÃO DOS DOIS FOTOSSENSIBILIZADORES

Na Figura 12 o gráfico de barras representa as diferenças no decréscimo de DNA obtido ao longo do tempo, em percentagem, para cada uma das porfirinas. Nos tempos 30, 60 e 90 min, verifica-se uma diferença significativa no decréscimo de DNA para as duas porfirinas em estudo, sendo que a porfirina Tri-Py⁺-Me-PF apresenta um decréscimo de DNA superior, comparativamente com a porfirina Tetra-Py⁺-Me. Nos tempos 180 e 270 min, os resultados obtidos para ambas as porfirinas são idênticos. Com base nestes resultados e, tendo em conta que existe uma relação direta entre o decréscimo de DNA e a inativação das células, infere-se que a porfirina Tri-Py⁺-Me-PF apresenta maior eficiência de inativação que a porfirina Tetra-Py⁺-Me.

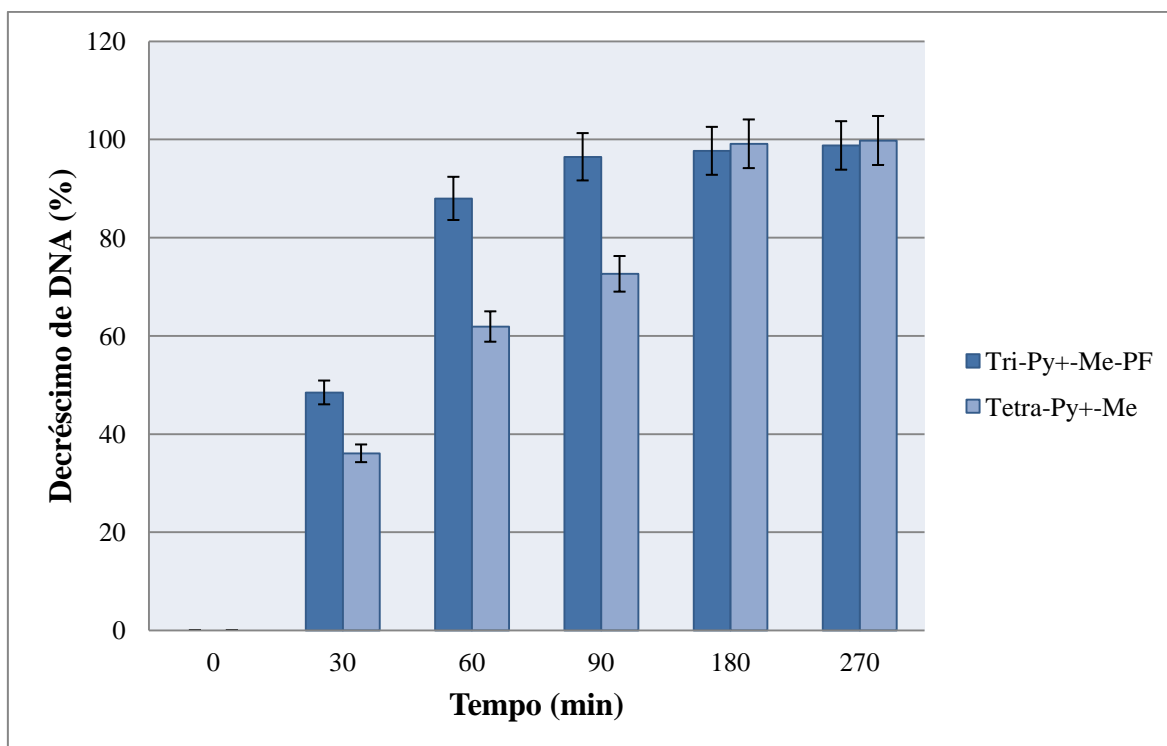


Figura 12. Decréscimo da concentração de dsDNA ao longo do tempo de irradiação – comparação entre os resultados obtidos para cada uma das porfirinas, Tri-Py⁺-Me-PF (azul escuro) e Tetra-Py⁺-Me (azul claro).

CAPÍTULO 4 – DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

DISCUSSÃO

Neste estudo, investigou-se o efeito fotodinâmico, causado por dois FS (Tetra-Py⁺-Me-PF e Tri-Py⁺-Me), nos ácidos nucleicos de *E. coli* e com recurso a duas abordagens metodológicas distintas. Uma das metodologias envolveu a extração dos ácidos nucleicos das células de *E. coli* após PDI, sendo que a outra metodologia consistiu na extração dos ácidos nucleicos desta bactéria, seguida de irradiação na presença do FS. Os ácidos nucleicos foram analisados por eletroforese em gel de agarose e quantificados por fluorimetria. As condições experimentais selecionadas (concentração bacteriana, concentração do FS e dose de luz) basearam-se em trabalhos anteriores (Alves et al., 2013).

Quando os ácidos nucleicos foram extraídos das células de *E. coli* após PDI, observaram-se reduções acentuadas nas quantidades de ácidos nucleicos (DNA genómico e rRNA) ao longo do tempo, para ambos os FS. Não se observou fotoclivagem significativa no DNA genómico, uma vez que as bandas de DNA, visualizadas após eletroforese em gel de agarose, quando presentes, não evidenciavam arrastamento (*smearing*). A variação na quantidade de DNA ao longo do tempo de irradiação, quantificado por fluorimetria, foi diretamente proporcional à variação da quantidade de células, o que está em concordância com estudos anteriores (Salmon-Divon et al., 2004; Caminos et al., 2008; Spesia et al., 2009; Spesia et al., 2013; Alves et al., 2013). Apesar de se ter verificado que os dois FS causaram efeitos semelhantes nos ácidos nucleicos, esta diminuição foi mais acentuada para a porfirina Tri-Py⁺-Me.

Relativamente ao efeito direto, ou seja, quando os ácidos nucleicos de *E. coli* foram extraídos e irradiados posteriormente na presença do FS, verificou-se, após análise dos resultados obtidos por eletroforese em gel de agarose, que a quantidade de DNA genómico não variou significativamente ao longo do tempo de irradiação. Não se observou fotoclivagem significativa no DNA genómico, o que sugere a integridade desta biomolécula. A média do decréscimo da concentração de DNA atingiu um valor máximo de 13,2% no tempo 180 min, para a porfirina Tri-Py⁺-Me-PF e 13,1% para a porfirina Tetra-Py⁺-Me, no tempo 60 min. Relativamente ao rRNA, observaram-se diminuições nas quantidades deste ácido nucleico, o que sugere que esta molécula é mais sensível ao efeito fotodinâmico que o DNA. Esta constatação está de acordo com o estudo de Alves et al., 2013, o qual sugere que a PDI afeta primeiramente o RNA e só depois o DNA, mas

contradiz os resultados de Salmon-Divon et al., 2004, de acordo com os quais a PDI afetava primeiro o DNA e só depois o RNA.

O efeito fotodinâmico nos ácidos nucleicos foi diferente para cada uma das abordagens metodológicas. Para o efeito indireto, a quantidade de DNA diminuiu ao longo do tempo, num padrão diretamente proporcional à inativação das células, verificando-se, no tempo 270 min, um decréscimo de DNA de 99,4% para a porfirina Tri-Py⁺-Me-PF e de 98,9%, para a porfirina Tetra-Py⁺-Me. Para o efeito direto, o decréscimo de DNA ao longo do tempo não está, aparentemente, relacionado com os valores de decréscimo de DNA para o efeito indireto, uma vez que foram obtidos valores de decréscimo de DNA consideravelmente inferiores para o efeito direto (valores máximo de cerca de 13% para o efeito direto contra valores máximos de aproximadamente 99% para o efeito indireto). Este estudo sugere que a diminuição na quantidade de DNA genómico, extraído após PDI, é uma consequência do estado de inativação das células. O aspeto comum em relação às duas abordagens metodológicas diz respeito ao efeito fotodinâmico no rRNA, o qual diminuiu ao longo do tempo. Tal como foi sugerido em estudos anteriores, o efeito do oxigénio singuleto no DNA ou o efeito indireto sobre a maquinaria de transcrição do RNA pode provocar um decréscimo acentuado na quantidade de RNA na célula (Sheridan et al., 1998). Este aspeto é relevante, uma vez que o rRNA é essencial à síntese proteica. Esta observação poderá indicar que o rRNA é um alvo importante da PDI, sendo importante realizar mais estudos no sentido de investigar o efeito da PDI nesta biomolécula. O método de extração de ácidos nucleicos utilizado neste trabalho era um método de extração de DNA que foi adaptado de modo a obter-se também o RNA e, como tal, em estudos futuros, deverão ser utilizados métodos específicos de extração e quantificação de RNA.

A informação na literatura relativa ao efeito fotodinâmico nos ácidos nucleicos bacterianos ainda é escassa. Existem vários estudos que demonstram que ocorre fotoclivagem de DNA (DNA do timo da vitela) após irradiação deste ácido nucleico na presença de um FS catiónico (ftalocianina ou porfirina) com recurso a uma metodologia idêntica à utilizada neste estudo para DNA genómico de *E. coli* (efeito direto) (Spesia et al., 2009; Quiroga et al., 2012; Spesia et al., 2013). Apesar de terem sido usadas metodologias semelhantes, no presente estudo não se observou fotoclivagem do DNA genómico de *E. coli*. O DNA genómico de *E. coli* (DNA procariótico) consiste numa molécula de DNA circular com cerca de $4,6 \times 10^3$ Kb, ao passo que o DNA do timo da

vitela (DNA eucariótico de *Bos taurus*) consiste numa molécula de DNA linear de tamanho aproximado correspondente a $3,0 \times 10^9$ Kb. Para além das diferentes naturezas do DNA do presente estudo em relação aos estudos citados anteriormente, as condições experimentais também foram diferentes, o que poderá explicar as divergências nos resultados obtidos. No presente estudo, a concentração do FS foi 5 μM , a irradiância foi 40 W m^{-2} e a dose de luz máxima foi 64,8 J cm^{-2} , correspondente a 4,5 h de irradiação; nos estudos de Spesia et al., 2009 e Spesia et al., 2013 a concentração do FS foi 20 μM , a irradiância foi 300 W m^{-2} e a dose de luz máxima foi 432 J cm^{-2} correspondente a 4 h de irradiação; no estudo de Quiroga et al., 2012, a concentração do FS foi 20 μM , a irradiância foi 900 W m^{-2} e a dose de luz máxima foi 1620 J cm^{-2} , correspondente a 5 h de irradiação. Assim, verifica-se que a irradiância e dose de luz máxima do presente estudo foram muito inferiores às utilizadas nos estudos referidos anteriormente, o que poderá justificar a ausência de fotoclivagem do DNA genómico de *E. coli*. Embora não se tenham observado danos no DNA, não se exclui a possibilidade de terem ocorrido danos não detetáveis pela metodologia utilizada neste trabalho.

CONCLUSÃO

O presente estudo permite concluir que quando as células bacterianas são irradiadas na presença dos dois FS, extraíndo-se posteriormente os ácidos nucleicos, nas condições experimentais testadas, o processo de PDI induz uma variação na quantidade de DNA ao longo do tempo de irradiação, num padrão diretamente proporcional à inativação das células. Todavia, a irradiação direta dos ácidos nucleicos, na presença dos dois FS, não induziu variações significativas na quantidade de DNA genómico ao longo do tempo de irradiação. O rRNA bacteriano é, aparentemente, sensível ao efeito fotodinâmico, com ambas as porfirinas testadas neste trabalho e para as duas abordagens metodológicas testadas (efeito indireto e efeito direto).

REFERÊNCIAS

Almeida, A., Cunha, A., Faustino, M. A. F., Tomé, A. C., Neves, M. G. P. M. S. Chapter 5 Porphyrins as Antimicrobial Photosensitizing Agents. Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications, R. Soc. Chem. 2011, 11: 83-160.

Alves, E., Faustino, M. A., Tomé, J. P. C., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Cunha, A., Gomes, N. C., Almeida, A. Nucleic acid changes during photodynamic inactivation of bacteria by cationic porphyrins." Bioorg Med Chem. 2013, 21(14): 4311-4318.

Brown, T. A. Genomes. 2nd ed. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2002. ISBN 1-85996-029-4. p. 37, 110.

Camino, D. A., Spesia, M. B., Pons, P., Durantini, E. N. Mechanisms of *Escherichia coli* photodynamic inactivation by an amphiphilic tricationic porphyrin and 5,10,15,20-tetra(4-N,N,N-trimethylammoniumphenyl) porphyrin. Photochem Photobiol Sci. 2008, 7(9): 1071-1078.

Costa, L., Faustino, M. A. F., Neves, M. G. P. M. S., Cunha, A., Almeida, A. Photodynamic inactivation of mammalian viruses and bacteriophages. Viruses. 2012, 4(7): 1034-1074.

Denyer, S. P., Maillard, J. Y. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. J Appl Microbiol. 2002, 92: 35S-45S.

Hamblin, M. R., Hasan, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? Photochem Photobiol Sci. 2004, 3(5): 436-450.

Hamblin, M. R., O'Donnell, D. A., Murthy, N., Contag, C. H., Hasan, T. Rapid control of wound infections by targeted photodynamic therapy monitored by in vivo bioluminescence imaging. Photochem Photobiol. . 2002, 75(1): 51-57.

Henderson, B. W., Dougherty, T. J. How does photodynamic therapy work? Photochem Photobiol. 1992, 55(1): 145-157.

Huang, L., Huang, Y. Y. Mroz, P., Tegos, G. P., Zhiyentayev, T., Sharma, S. K., Lu, Z., Balasubramanian, T., Krayner, M., Ruzié, C., Yang, E., Kee, H. L., Kirmaier, C., Diers, J. R., Bocian, D. F., Holten, D., Lindsey, J. S., Hamblin, M. R. Stable synthetic cationic bacteriochlorins as selective antimicrobial photosensitizers. Antimicrob Agents Chemother. 2010, 54(9): 3834-3841.

Huang, L., Denis, T. G., Xuan, Y., Huang, Y. Y., Tanaka, M., Zadlo, A., Sarna T., Hamblin, M. R. "Paradoxical potentiation of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic inactivation by sodium azide: role of ambient oxygen and azide radicals." Free Radic Biol Med. 2012, 53(11): 2062-2071.

Huang, L., Xuan, Y., Koide, Y., Zhiyentayev, T., Tanaka, M., Hamblin, M. R. "Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: An in vitro study on Gram-negative and Gram-positive bacteria." Lasers Surg Med. 2012, 44(6): 490-499.

Jori, G., Brown, S. B. "Photosensitized inactivation of microorganisms." Photochem Photobiol Sci. 2004, 3(5): 403-405.

Jori, G., Coppelotti, O. Inactivation of Pathogenic Microorganisms by Photodynamic Techniques: Mechanistic Aspects and Perspective Applications. Curr. Med. Chem.: Anti-Infect. Agents. 2007, 6(2): 119-131.

Kessel, D. Photodynamic therapy: from the beginning. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2004, 1(1): 3-7.

Lin, S. L., Hu, J. M., Tang, S. S., Wu, X. Y., Chen, Z. Q., Tang, S. Z. Photodynamic inactivation of methylene blue and tungsten-halogen lamp light against food pathogen *Listeria monocytogenes*. Photochem Photobiol. 2012, 88(4): 985-991.

- Malik, Z., Ladan, H., Nitzan, Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. J Photochem Photobiol B. 1992, 14(3): 262-266.
- Mitton, D., Ackroyd, R. History of photodynamic therapy in Great Britain. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2005, 2(4): 239-246.
- Mitton, D., Ackroyd, R. A brief overview of photodynamic therapy in Europe. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2008, 5(2): 103-111.
- Munson, B. R., Fiel, R. J. DNA intercalation and photosensitization by cationic meso substituted porphyrins. Nucleic Acids Res., 1992, 20(6): 1315-1319.
- Nikaido, H. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. Semin Cell Dev Biol. 2001, 12(3): 215-223.
- Perussi, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. Química Nova. 2007, 30: 988-994.
- Richards, A. D., Rodgers, A. Synthetic metallomolecules as agents for the control of DNA structure. Chem. Soc. Rev. 2007, 36 (3): 471–483.
- Quiroga, E. D., Cormick, M. P., Pons, P., Alvarez, M. G., Durantini, E. N. Mechanistic aspects of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* induced by cationic porphyrin derivatives. Eur J Med Chem. 2012, 58: 332-339.
- Sheridan, G. E. C., Masters, C. I., Shallcross, J. A, Mackey, B. M. Detection of mRNA by Reverse Transcription-PCR as an Indicator of Viability in *Escherichia coli* Cells. Appl. Environ. Microbiol. 1998, 64(4): 1313–1318.
- Spesia, M. B., Caminos, D. A., Pons, P., Durantini, E. N. Mechanistic insight of the photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by a tetracationic zinc(II) phthalocyanine derivative. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2009, 6(1): 52-61.

- Spesia, M. B., Durantini, E. N. Photodynamic inactivation mechanism of *Streptococcus mitis* sensitized by zinc(II) 2,9,16,23-tetrakis[2-(N,N,N-trimethylamino)ethoxy]phthalocyanine. J Photochem Photobiol B. 2013, 125: 179-187.
- Spesia, M. B., Rovera, M., Durantini, E. N. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mitis* by cationic zinc(II) phthalocyanines in media with blood derivatives. Eur J Med Chem. 2010, 45(6): 2198-2205.
- Denis, T. G. S., Dai, T., Izikson, L., Astrakas, C., Anderson, R. R., Hamblin, M. R., Tegos, G. P. All you need is light: antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease. Virulence. 2011, 2(6): 509-520.
- Tavares, A., Dias, S. R. S., Carvalho, C. M. B., Faustino, M. A. F., Tomé, J. P. C., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Cunha, A., Gomes, N. C. M., Alves, E. Almeida, A. Mechanisms of photodynamic inactivation of a Gram-negative recombinant bioluminescent bacterium by cationic porphyrins. Photochem Photobiol. Sci. 2011, 10: 1659.
- Vera, D. M., M., Haynes, M. H., Ball, A. R., Dai, T., Astrakas, C., Kelso, M. Hamblin, M. R. Tegos, G. P Strategies to potentiate antimicrobial photoinactivation by overcoming resistant phenotypes. Photochem Photobiol. 2012, 88(3): 499-511.
- Wainwright, M., M. N. Byrne, Gattrell, M. A. Phenothiazinium-based photobactericidal materials. J Photochem Photobiol B. 2006, 84(3): 227-230.
- Williams, L. D., Egli, M., Gao, Q., Rich, A. DNA Intercalation: Helix unwinding and Neighbor-Exclusion. Nucleic Acids. 1992, 1: 107-125.